

**BEEINFLUSSUNG DES DNS-GEHALTES BEI
BULLENSPERMIEN NACH STÖRUNG
DER SPERMATOGENESE DURCH WÄRME**

Johann Widmann

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung
an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der
Universität München

Leiter: Prof. Dr. W. Leidl

BEEINFLUSSUNG DES DNS-GEHALTES BEI BULLENSPERMIEN NACH
STÖRUNG DER SPERMATOGENESE DURCH WÄRME

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Johann Widmann
aus Niederscheyern
München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. E. Dahme
Referent:	Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent:	Prof. Dr. K. H. Tempel

Tag der Promotion: 22. 2. 1974



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATUR	2
1.	Spermatogenese	2
1.1.	Physiologischer Ablauf der Spermatogenese	2
1.1.1.	Cytologische Prozesse der Spermatogenese	2
1.1.2.	Synthese und Änderung des DNS-Gehaltes im Ablauf der Spermatogenese	3
1.2.	Störung der Spermatogenese durch Noxen ver- schiedener Art	6
1.3.	Störung der Spermatogenese durch spezifisch angreifende Noxen	8
1.3.1.	Röntgenstrahlen	8
1.3.2.	Genetische Faktoren	8
1.3.3.	Testikuläre Wärmeeinwirkung	9
2.	DNS-Gehalt von Spermien	14
2.1.	DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermien	15
2.1.1.	Gesetz der DNS-Konstanz	15
2.1.2.	Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes	16
2.2.	DNS-Gehalt morphologisch abnormaler Spermien	18
2.2.1.	Morphologisch abnormale Spermien und ihr DNS- Status nach testikulärer Röntgenbestrahlung	19
2.2.2.	Genetisch bedingte, morphologisch mißge- bildete Spermien und ihr DNS-Gehalt	21
2.2.3.	Schlußfolgerung: Beziehungen zwischen Meiose- störungen, Teratospermie und DNS-Gehalt	22
3.	Ermittlung des DNS-Gehaltes von Spermien	24
III	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
1.	Material	25
2.	Versuchsanordnung und -durchführung	26

	Seite
3.	Spermagewinnung und Spermabeurteilung 27
4.	Herstellung der Präparate 28
5.	Arbeitsweise des verwendeten Spektral- photometers 29
6.	Berechnung des DNS-Gehaltes 30
7.	Statistik 30
IV	ERGEBNISSE 31
1.	Spermawerte 31
2.	DNS-Gehalt 38
2.1.	Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes in der Kontrollperiode 38
2.2.	DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermien in den verschiedenen Versuchsperioden 39
2.3.	DNS-Gehalt morphologisch abnormaler Spermien in den verschiedenen Versuchsperioden 41
V	DISKUSSION 45
VI	ZUSAMMENFASSUNG 51
VII	SUMMARY 52
VIII	LITERATURVERZEICHNIS 53

I EINLEITUNG

Außer Fertilitätsstörungen beschäftigt Mediziner und Genetiker in immer höherem Maße die Pathogenese von Fehl- und Mißgeburten, zumal begründete Annahmen bestehen, daß Störungen in der Gravidität und foetale Mißbildungen zum Teil auf Genschäden zurückzuführen sind.

Die Erkenntnis der dominierenden Rolle der Nukleinsäuren, besonders der DNS (Desoxyribonucleinsäure) als "väterliche genetische Information" im Kern von Spermien, hat dazu geführt, diese biologisch wichtigen Substanzen in Samenzellen unter den verschiedensten Gesichtspunkten zu studieren.

Im Rahmen eines größeren Arbeitsprogrammes über die DNS in Spermien und in Weiterführung der bereits abgeschlossenen Arbeit: "Der DNS- und Histongehalt normaler und abnormaler Spermien" (BOTZENHARDT 1971), soll in diesen Untersuchungen gezeigt werden, ob und in welchem Maße sich der DNS-Gehalt von Bullenspermien nach artifizieller Schädigung der Spermatogenese durch Wärme verändert.

II LITERATUR

1. Spermatogenese

1.1. Physiologischer Ablauf der Spermatogenese

1.1.1. Cytologische Prozesse der Spermatogenese

Die Spermatogenese geht aus von den sogenannten Gonozyten, aus denen die Stammspermatogonien entstehen. Die Anzahl der mitotischen Teilungsvorgänge des Spermatogonienvermehrungszyklus ist tierartlich unterschiedlich (ROOSEN-RUNGE 1969). Beim Bullen gibt es nach Ansicht einiger Autoren (ORTAVANT 1959, KRAMER 1960) fünf, nach anderer Quelle jedoch sechs Generationen (HOCHEREAU de REVIERS 1970). Die Klassifizierung der einzelnen cytologischen Stadien erfolgt in die Typen A_1 , A_2 , Intermediär, B_1 und B_2 (ORTAVANT 1959, KRAMER 1960) bzw. in die zusätzlichen Typen A_3 und A_0 (HOCHEREAU de REVIERS 1970), wobei letztere als Reservezelle am Spermatogonienvermehrungszyklus nicht teilhat.

Die primären Spermatozyten, die aus obigem Teilungsprozeß resultieren, durchlaufen anschließend zwei Reifeteilungen. Aus ihnen entstehen zunächst die sekundären Spermatozyten und in einer weiteren Meiose die Spermatiden. Im letzten Schritt der Spermatogenese, der Spermiohistogenese, erfolgt die Transformation der Spermatiden in die reifen Samenzellen (ORTAVANT 1959, BERCHTOLD 1963, HOCHEREAU de REVIERS 1970). Alle diese Teilungs- und Umbildungsvorgänge laufen streng geregelt und zeitlich synchron ab (LEIDL 1968).

Die Dauer der verschiedenen spermatogenetischen Vorgänge von der Bildung der primären Spermatozyten bis zur Abgabe der reifen Spermien in das freie Tubuluslumen beträgt beim Bullen 40 Tage (ORTAVANT 1959, AMANN und ALMQUIST 1962). Im einzelnen umfaßt die erste meiotische Teilung beim Bullen einen Zeitraum von 17 Tagen, die zweite meiotische Teilung

von 1,4 Tagen und die Transformation von 21 Tagen. Die Nebenhodenpassage dauert 8 - 10 Tage (KOEFOED-JOHNSON 1960).

Da die Spermatogenese durch den sogenannten Kdmepithelzyklus einem konstanten Zeitablauf unterliegt und die Dauer der Nebenhodenpassage der Spermien nur eine geringe Variation aufweist, ist es möglich, aus der zeitlichen Beziehung zwischen einer Schädigung des Germinativums und dem Auftreten von Veränderungen im Sperma Rückschlüsse auf den Eintritt und die Auswirkung einer testikulären Noxe zu ziehen.

1.1.2. Synthese und Änderung der DNS im Ablauf der Spermatogenese

Bestimmte Stadien der Spermatogenese zeigen eine erhöhte Wärmeempfindlichkeit, so die B-Spermatogonien, das Pachytän der ersten meiotischen Teilung und die Spermientransformation (siehe Kapitel 1.3.). Diese Erkenntnis könnte eine Verbindung herstellen zu den Beobachtungen von SIMARD und BERNHARD (1967), daß die Nukleoli bestimmter Zellen eine spezifische Thermo-sensibilität besitzen, deren gestörte Aktivität wiederum die Synthese der Nukleinsäuren zu hindern vermag.

Die Teilungsvorgänge des Spermatogonienvermehrungszyklus lassen sich in die Stufen "G₁", "S", "G₂" und "M" einteilen, wobei "S" der Zeitraum der DNS-Synthese ist. "G₁" und "G₂" sind die Perioden von der vorausgehenden Teilung "M" bis zum Beginn der DNS-Synthese und vom Ende der "S"-Phase bis zur folgenden mitotischen Zellteilung "M". Die Bildung der RNS und der Proteine erfolgt in den Perioden "G₁", "S" und "G₂" (BLOOM und FAWCETT 1968).

HOCHEREAU (1967) ermittelte die Länge der "S"-Phasen im Spermatogonienvermehrungszyklus und die Lebensdauer der entsprechenden Zellen beim Bullen (Tabelle 1).

Tabelle 1: "S"-Phase und Lebensdauer der Spermatogonien beim Bullen (nach HOCHEREAU, 1967).

Spermatogonien	"S"-Phase	Lebensdauer
A ₁	11,9 Std.	9,5 Tg.
A ₂	11,4 Std.	45 Std.
A ₃	13,5 Std.	60 Std.
I	17,3 Std.	60 Std.
B ₁	20,9 Std.	72 Std.
B ₂	19,6 Std.	48 Std.

Im Präleptotän der ersten meiotischen Teilung findet über einen langen Zeitraum, der beim Bullen 28 Stunden beträgt, eine sehr intensive DNS-Synthese statt, die in das Leptotän weiterschreitet und unmittelbar vor der Spiralenbildung der Chromosomen in der meiotischen Prophase endet (HOCHEREAU 1967). Bei anderen untersuchten Spezies wird das Leptotän als Hauptsynthesestadium der DNS angesehen (SWIERSTRA und FOOTE 1965, SWIERSTRA 1968). Das späte Leptotänstadium enthält einen tetraploiden DNS-Gehalt (SIFT und KLEINFELD 1953), der für die nun folgenden zwei Reifeteilungen notwendig ist, um nach der zweiten meiotischen Teilung Zellen mit einem haploiden DNS-Gehalt zu erhalten (Tabelle 2). WIMBER und PRENSKY (1963) und MUHAMMADJEE und COHEN (1968) glaubten auch im frühen Pachytänstadium noch eine gewisse DNS-Synthese feststellen zu können.

Tabelle 2: Änderung des DNS-Gehaltes in der ersten meiotischen Teilung beim Bullen (ESNAULT 1965, zit. nach COUROT et al. 1970)

Spermatozyt I	
Präleptotän	$13,2 \pm 0,21^*$
Leptotän	$27,8 \pm 0,34$
Zygotän	$27,9 \pm 0,16$
Pachytän	$27,1 \pm 0,15$
Diplotän	$27,1 \pm 0,27$
Spermatozyt II	$13,1 \pm 0,16$

* ermittelt durch UV-Mikrospektrophotometrie nach RN-ase Behandlung; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (Arbeits-Einheiten)

In der sehr schnell ablaufenden zweiten meiotischen Teilung wird der DNS-Gehalt auf den haploiden Wert reduziert. Bei der darauf folgenden Generation der Spermatiden und testikulären Spermien findet keine Veränderung der DNS mehr statt (GLEDHILL 1966 a, 1966 c; LAVON et al. 1971).

1.2. Störung der Spermatogenese durch Noxen verschiedener Art

Eine große Anzahl endogener und exogener Noxen kann zu Störungen der Spermatogenese bei den Haussäugetieren führen. Die embryonale Entwicklung, die anatomisch-morphologische Situation und die empfindlichen Stoffwechselmechanismen der Testes ermöglichen eine Vielzahl von Störungen der physiologischen Funktion der Gonaden.

Es ist zu erwarten, daß die Bedeutung und Wirkungsweise verschiedener endogener und exogener Faktoren auf die Samenbildungsprozesse nicht genau abzuklären sind. Dies liegt einmal daran, daß verschiedene Noxen hinsichtlich Intensität und Dauer, z. B. Krankheiten, nicht standardisierbar sind, zum anderen, daß manche Noxen von sehr komplexer Natur sind, wie z. B. Fütterungsfehler. Dazu komplizieren noch speziesbedingte und altersabhängige Unterschiede diese Fragestellung.

Am Beispiel der Fütterung zeigen Untersuchungen, daß Überernährung, besonders in der juvenilen Entwicklungsphase, schädlichere Auswirkungen auf die Libido, Tätigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Spermaqualität hat (KORDTS und HILDEBRAND 1958), als eine knappe Ernährungsweise (MANN und WALTON 1953). Den Einfluß einzelner Futterfaktoren, wie Kohlenhydrate, Eiweiß, Fett, Mineralstoffe, Vitamine usw., an dieser Stelle detailliert aufzuführen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Neben der Fütterung spielen spezifische Erkrankungen der Testes eine bedeutende Rolle. Entzündungen der Hoden, sei es viraler Art (BOUTERS und VANDEPLASSCHE 1964), bakterieller (SCHAETZ 1965) oder mykotischer Genese (GROSHKOVA 1964), können zu einer Degeneration des Keimepithels infolge des infektiösen, mechanischen und thermischen Geschehens führen. Auch Allgemeinerkrankungen, die mit einer erheblichen Steigerung der Körpertemperatur einhergehen, können Störungen der

Spermatogenese mit sich bringen (MAC LEOD 1952).

Ebenso gehören in die lange Reihe von endogenen oder exogenen Faktoren, welche die Spermatogenese zu stören vermögen, die Geschwülste der männlichen Gonaden (NIEBERLE 1952) und eine große Anzahl chemischer Substanzen aus einer verseuchten Umwelt oder auch in medizinisch-therapeutischer Anwendung (NELSON et al. 1954, SWIERSTRA et al. 1963).

1.3. Störung der Spermatogenese durch spezifisch angreifende Noxen

Neben erworbenen, umweltbedingten Störungen der Spermatogenese gibt es eine Reihe gut definierter Defekte der Gonaden, teils exogener, teils genetisch bedingter Art, die durch Anomalien in der Zellteilung oder durch intrachromosomale Abweichungen bedingt sind.

1.3.1. Röntgenstrahlen

Die Keimzellen der Tubuli sind sehr empfindlich gegenüber Röntgenstrahlen. Es liegt eine direkte Wirkung auf das Germinativum vor, die stark von der Strahlenart und der Dosis abhängig ist (OAKBERG 1955). Hohe Strahlendosen beeinflussen sowohl mitotische als auch meiotische Teilungsvorgänge (LEIDL und BERCHTOLD 1964). Besonders in der ersten meiotischen Teilung kann es infolge einer Störung der Kernspindel zu einer anomalen Verteilung der Chromosomen kommen (RUGH 1960). Das Spermiogramm zeigt in der 5. Woche nach lokaler, testikulärer Röntgenbestrahlung (Dosis 500 R) eine Zunahme pathologisch geformter Spermien mit einem Höhepunkt in der 6. und 7. Woche p. irradi. infolge Schädigung der Spermienvorstufen in der zweiten meiotischen und im Endstadium der ersten meiotischen Teilung. Das Absinken der Spermiedichte in der 7. Woche p. irradi. und das Auftreten einer Oligospermie in der 12. und 14. Woche p. irradi. haben ihre Ursache im Sistieren der mitotischen Teilungsvorgänge des Spermatogonienvermehrungszyklus (LEIDL und BERCHTOLD 1964).

1.3.2. Genetische Faktoren

Die bei der partiellen, angeborenen Hodenhypoplasie des Bullen auftretenden cytomorphologischen Anomalien sind gut be-

kannt (KNUDSEN 1961 a). Dabei läuft die Spermatogenese nur bis zu den primären Spermatozyten ab. Als Ursache dieser Störung zeigt sich eine sogenannte "stickiness" der Chromosomen, die aus einer Teilungsstörung im Pachytänstadium der ersten meiotischen Teilung resultiert. Die primären Spermatozyten enthalten Chromosomen mit anomalen Bivalenten, Multivalenten, Bruchstücken oder einer indifferenten Chromatinmasse. Im Ejakulat solcher Tiere sind Azoospermie oder spermienähnliche Körper mit pyknotischen Kernen zu sehen.

Eine weitere Störung der ersten meiotischen Teilung generischer Art ist die Bildung einer multiplen Kernspindel (KNUDSEN 1961 b).

Ebenfalls genetisch bedingt ist die Spermatogenesestörung bei der F_1 -Generation bestimmter Mäusekreuzungen. Sie ist wegen der dabei nachgewiesenen Zusammenhänge zwischen Meiosestörungen, vermehrtem Auftreten chromosomal unbalancierter Spermien und Beeinträchtigung des Befruchtungsvermögens ein ideales Modell für die Fertilitätsforschung (siehe Kapitel 2.2.2.).

1.3.3. Testikuläre Wärmeeinwirkung

Die Testes benötigen für einen physiologischen Ablauf der Spermatogenese eine gewisse konstante Temperatur (BISHOP und WALTON 1960), die tiefer ist als die zentrale Körpertemperatur und tierartliche Unterschiede aufweist (Tabelle 3).

Tabelle 3: Physiologische Temperaturdifferenz zwischen Körper und Hoden verschiedener Spezies in ° C; Messung ohne Anästhesie (nach WAITES 1970)

Spezies	Körper ° C	Hoden ° C
Ratte	36,9	32,9
Schaf	39,2	35,3
Rind	38,6	34,6
Mann	37,0	33,9

Die Auswirkungen erhöhter Umgebungstemperaturen auf die Samenqualität und Fruchtbarkeit männlicher Individuen ist bereits bekannt (Bulle: ALBA und RIERA 1966, Mann: LAMAS und RODGERS 1943). Die exakten näheren Zusammenhänge, etwa die Fragen nach dem Angriffspunkt einer Wärmenoxe im Ablauf der Spermatogenese oder nach der besonderen Empfindlichkeit spermatogenetischer Entwicklungsstufen ergaben Experimente mit genau dosierter, lokaler Wärmeapplikation (ELAZAB 1966, STEINBERGER und DIXON 1959).

Eine Erhöhung der intratestikulären Temperatur kann artifiziell auf verschiedene Weise herbeigeführt werden, so etwa durch experimentellen Kryptorchismus (MOORE 1924, NELSON 1951, CLEGG 1963), durch künstlich erzeugtes Fieber (MAC LEOD und HOTSCHKISS 1941, CASADY et al. 1953, MOULE und WAITES 1963) oder exogene Wärmeapplikation mittels warmen Wassers (ELAZAB 1966, WAITES und ORTAVANT 1968) oder erwärmter Luft (WAITES und MOULE 1961).

Über die Auswirkungen lokaler, testikulärer Erwärmung auf das Germinativum bestand lange Zeit Unklarheit, da die einzelnen Untersucher (YOUNG 1927, ASDELL und SALISBURY 1941,

WRETE 1944, GÜENSEL 1949, ELAZAB 1966) unterschiedliche Versuchsanordnungen, verschiedene Versuchstiere und nicht einheitliche Temperaturen gebrauchten. Zudem erfolgte in keinem Fall eine exakte Messung der tatsächlichen intratestikulären Temperatur.

Zusammenfassend bringen diese Untersuchungen folgendes Ergebnis, daß sowohl verschiedene Abschnitte der Spermatogenese in unterschiedlicher Weise auf eine ein- oder mehrmalige Wärmeeinwirkung reagieren als auch tierartlich bedingte differente Reaktionen des Keimepithels nach einer Wärmenoxe eintreten.

Die Untersuchungen von STEINBERGER und DIXON (1959) über lokale Wärmeapplikation an Hoden von Ratten mit exakter intratestikulärer Temperaturmessung zeigen, daß die Höhe der angewandten Temperatur entscheidend ist für die Art der degenerativen Vorgänge im Epithel der Tubuli. Bei einer intratestikulären Temperatur von 43°C über die Dauer von 8 - 9 Minuten werden die primären Spermatozyten in ihrer Morphologie am meisten geschädigt. Sie weisen Riesenzellbildung, Karyolysis und andere Degenerationerscheinungen auf. Dagegen bleiben die Spermatozoen, Spermatiden und Spermatogonien intakt. Bei einer intratestikulären Temperaturerhöhung auf 45°C über 15 Minuten treten vielkernige Riesenspermatiden auf, und die primären Spermatozyten zeigen Störungen in den meiotischen Teilungsvorgängen.

Was die Empfindlichkeit der einzelnen Entwicklungsstufen in der Spermatogenese betrifft, so vermutet GÜENSEL (1949) eine selektive Schädigung der Spermatogonien bei der Ratte durch hohe, testikuläre Temperaturen, ähnlich der Wirkung von Röntgenstrahlen. Diesen spezifisch schädigenden Einfluß von Wärme können andere Autoren wiederum nicht beobachten (STEINBERGER und DIXON 1959). WAITES und ORTAVANT (1967 und 1968) finden beim Schaf, daß die A_1 - und Intermediärspermatogonien

nicht geschädigt werden. Viele der B-Spermatogonien aber vollenden ihre Mitosen nicht, indem sie zwischen Prophase und Metaphase blockiert werden. Andererseits zeigen sich die Spermatogonien der Maus (PAYNE 1956), der Ratte (CHOWDHURY und STEINBERGER 1964) und des Schweines (MAZZARRI et al. 1968) vollkommen unempfindlich gegenüber lokaler, testikulärer Erwärmung oder Kryptorchismus.

Eine Erklärung für das tierartlich unterschiedliche Verhalten der Spermatogonien gegenüber Wärme soll sein, daß der Blutfluß in den Testes der Nager mit zunehmender Temperatur steigt (GLOVER 1966), während dies bei den Wiederkäuern nicht der Fall ist und somit daraus eine lokale Hypoxie resultiert (SETCHELL et al. 1966).

Die Spermatozyten sind ein besonders wärmeempfindliches zytologisches Stadium in der Spermatogenese (STEINBERGER und DIXON 1959, WAITES und ORTAVANT 1967, 1968). Gewisse Schritte der relativ langen Prophase der ersten meiotischen Teilung sind bei allen Spezies sehr thermosensibel: Dies sind der Übergang vom Zygotän in das Pachytän und das Pachytän selbst (WAITES und ORTAVANT 1967, 1968, MAZZARRI et al. 1968). Die wenigen überlebenden Spermatozyten I weisen zytoplasmatische Veränderungen auf.

Nach der zweiten meiotischen Teilung führt eine Temperaturerhöhung zur Schädigung der runden Spermatiden, die die Tendenz zur Bildung vielkerniger Riesenzellen besitzen (STEINBERGER und DIXON 1959, WAITES und ORTAVANT 1968, MAZZARRI et al. 1968). Die empfindlichste Phase ist bei der Dehnung des Zellkernes zu beobachten (ROOSEN-RUNGE 1955, ORTAVANT 1958). Diese Zellen erfahren eine morphologische Veränderung des Kernes in Form von Pyknose und Auflösung des Chromatins.

Spermien im Nebenhoden von Kaninchen erleiden keine morphologischen oder chemischen Veränderungen mehr durch eine Wärmelast (BOUTERS et al. 1967). Dagegen beobachtet ELAZAR (1966) beim Bullen die Entstehung schwanzloser Spermatozoen während der Nebenhodenpassage, wobei die reiferen Samenzellen im

Nebenhodenschwanz sich widerstandsfähiger erweisen als solche im Nebenhodenkopf.

Die durch eine Wärmenoxe hervorgerufenen Schädigungen der verschiedenen Keimepithelstufen, die im histologischen Schnitt gut erkennbar sind (ELAZAB 1966), manifestieren sich in typischen, reproduzierbaren Veränderungen des Samenbildes. Diese treten, abhängig von der Dauer der Spermatogenese und der Nebenhodenpassage, zeitlich versetzt in bestimmten Abständen nach Einwirkung der Wärmenoxe auf.

So sind bei konstanter Versuchstemperatur (43°C) in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung einer Noxe in unterschiedlichen Zeitabständen Spermienmißbildungen im Ejakulat zu sehen (ELAZAB 1966).

Bei 1- und 3-stündiger testikulärer Erwärmung erscheinen vermehrt primäre Mißbildungen nach der 3. Woche. Zwischen der 4. und 7. Woche ist eine Zunahme sekundärer Schwanzmißbildungen zu sehen. Dagegen treten bei 6- bis 18-stündiger Hodenerwärmung bereits 9 Tage post operationem in einem erhöhten Prozentsatz sogenannte "lose Köpfe" auf.

Die Abnahme der Dichte steht in direkter Relation zur Dauer der Wärmenoxe, wobei eine länger als 12 Stunden einwirkende Erwärmung von 43°C in der 4. Woche zur Azoospermie führt (ELAZAB 1966).

Die Dauer der Spermatogenese scheint durch exogene Wärme- einwirkung auf das Germinativum, selbst verbunden mit einer teilweisen Zerstörung desselben, nicht beeinflusst zu werden (CHOWDHURY und STEINBERGER 1964, WAITES und ORTAVANT 1968).

2. DNS-Gehalt von Spermien

Die Möglichkeit, den DNS-Gehalt der einzelnen Samenzelle mit Hilfe der UV-photometrischen Methoden (siehe Kapitel 3) exakt zu bestimmen und damit eine Aussage über die genetische Substanz dieser Zellen machen zu können, ist für die Fertilitätsforschung von großer Bedeutung. So war der Gedanke nahe-liegend, diese Methode als Diagnostikum in solchen Fällen anzuwenden, in denen die üblichen spermatologischen Untersuchungsverfahren keinen Hinweis auf die Ursache der herab-gesetzten Fertilität oder Sterilität geben.

Tatsächlich konnten LEUCHTENBERGER und Mitarbeiter (1953, 1956), die solche Untersuchungen als erste durchführten, Be-ziehungen zwischen dem Feulgen-DNS-Gehalt der Spermien und der Fruchtbarkeit sowohl beim Mann als auch beim Pullen fest-stellen. Spätere Untersuchungen (LEUCHTENBERGER et al. 1955, 1957) erbringen recht unterschiedliche und sich widersprechende Ergebnisse. Diese sind, wie analoge Paralleluntersuchungen mit der Feulgen-Photometrie und der UV-Photometrie zeigen (GLEDHILL 1966 a), zum Teil auf die mit der Feulgen-Photo-metrie verbundenen Fehlermöglichkeiten zurückzuführen. Als weitere Fehlerquelle muß neben den methodischen Schwierig-keiten das Ausgangsmaterial betrachtet werden, das die ver-schiedenen Autoren verwenden. Da die sub- bzw. infertilen Samenspende-r hinsichtlich der Ursache der Infertilität mit Sicherheit heterogen waren (GLEDHILL 1966 b), ist es bei retrospektiver Betrachtung der Literatur sehr schwierig, Beziehungen zwischen einem atypischen Spermien-DNS-Gehalt und bestimmten Formen männlicher Infertilität allgemein gültig zu behaupten oder abzulehnen. Die große biologische und im Bereich der Tiermedizin auch wirtschaftliche Bedeutung dieser Frage war ein Anstoß für weitere gezielte Untersuchungen in den letzten Jahren.

Die verbesserten cytogenetischen Methoden eröffnen die Mög-lichkeit, Korrelationen zwischen bestimmten chromosomalen Anomalien der Spermienvorstufen und des DNS-Gehaltes der

Samenzellen zu überprüfen. Dabei gewinnen die morphologisch abnormalen Spermatozoen mehr und mehr an Interesse.

Des weiteren konnte der Einfluß verschiedener Faktoren, die den Spermien-DNS-Gehalt in vivo und in vitro zu ändern vermögen und deswegen vielleicht die Beziehung zwischen dem chromosomalen Status und dem DNS-Gehalt der Spermien verschleiern, geklärt werden.

Im folgenden soll der heutige Kenntnisstand, soweit er für das Verständnis der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Problematik erforderlich ist, kurz dargestellt werden.

2.1. DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermien

2.1.1. Gesetz der DNS-Konstanz

In einem vielzelligen Organismus haben unter physiologischen Bedingungen alle diploiden Zellen gleiche Chromosomensätze. Dieser Konstanz der Chromosomenverteilung entspricht eine konstante DNS-Menge somatischer Zellkerne (BOVIN et al. 1948, VEJNRELY 1955). Ebenso verhält es sich bei den männlichen Samenzellen, die entsprechend ihrer Funktion nur mit einem haploiden DNS-Gehalt ausgestattet sind.

DNS-Messungen morphologisch normaler Spermien beim Bullen mit verschiedenen Untersuchungsmethoden ergeben folgende Werte (Tabelle 4):

Tabelle 4: DNS-Gehalt morphologisch normaler Bullenspermien,
bestimmt mit verschiedenen Methoden

Methode	DNS $\times 10^{-12}$ $\bar{x} \pm s$ g/Spermium	Untersucher
chemisch	3,30	VENDRELY u. VENDRELY (1948)
chemisch	3,30	BHARGAVA et al. (1959)
chemisch	2,95	SUMMERHILL u. ODDS (1961)
Feulgen- Photometrie	3,04	LEUCHTENBERGER et al. (1956)
UV-Photometrie	3,24	SANDRITTER et al. (1960)
UV-Photometrie	$3,19 \pm 0,14$	STOLLA (1968)
UV-Photometrie	$3,14 \pm 0,15$	BOTZENHARDT (1971)

2.1.2. Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes

Der DNS-Gehalt von Spermien ist tierartlich verschieden und artcharakteristisch. Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, bestehen Unterschiede zwischen den ermittelten Werten verschiedener Autoren. Als Ursache dafür sind sowohl Fehler methodischer Art zu vermuten, als auch individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes innerhalb einer Spezies. UV-photometrische Untersuchungen jüngerer Datums (LEIDL und STOLLA 1969, STOLLA 1970, BOTZENHARDT 1971, STOLLA 1972) an morphologisch normalen Spermien verschiedener Haustiere mit ungestörtem Spermabild und voller Fertilität ergeben, daß auch

innerhalb einer Spezies individuell bedingte Differenzen des DNS-Gehaltes auftreten können, ebenso auch erhebliche Abweichungen im DNS-Gehalt einzelner, morphologisch normaler Spermien von ein und demselben Vertreter einer Art möglich sind.

Diese statistisch gesicherten Ergebnisse stehen in Widerspruch mit dem von BOVIN und Mitarbeiter (1948) aufgestelltem "Gesetz der DNS-Konstanz". Als Erklärung für diese Divergenz diskutieren BOSSE und MEYHÖFER (1970) etwaige Schwankungen im Proteingehalt der Spermien, während KRZANOWSKI und MACKOWSKA (1969) die Möglichkeit einer "zusätzlichen DNS" ohne jeglichen genetischen Informationsinhalt in Erwägung ziehen. Bei der Spezies Maus soll eine sogenannte "Satelliten-DNS" in Erscheinung treten, d. h. eine genetisch inaktive DNS, die etwa 10 % des Gesamt-DNS-Gehaltes einer Samenzelle beträgt (JONES und ROBERTSON 1970). Vorläufige Ergebnisse weisen auf individuelle Unterschiede in dieser DNS-Fraktion hin (JONES et al. -), welche die Variationen im Gesamt-DNS-Gehalt zwischen verschiedenen Individuen bei der Spezies Maus erklären könnten.

Hierbei muß betont werden, daß geringfügige Anomalien des chromosomalen Aufbaues der Spermien, vor allem solche struktureller Art, mit den heutigen Methoden der DNS-Bestimmung nicht nachzuweisen sind. Ein wesentlicher Grund dafür dürften die genannten individuellen Unterschiede schon unter physiologischen Voraussetzungen sein (STOLLA et al. 1973). Diese Ansicht vertreten auch GLEDHILL et al. (1970), die bei Ebern und Bullen mit nachgewiesener Chromosomentranslokation keine Korrelation zwischen dem DNS-Gehalt der Spermien und ihrer chromosomalen Konstellation feststellen können.

2.2. DNS-Gehalt morphologisch abnormaler Spermien

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an morphologisch normalen Spermien liegen bei abnormalen Spermien relativ wenige Mitteilungen über ihren DNS-Gehalt vor. Erst in jüngster Zeit erwacht das Interesse dafür.

Die Annahme ist naheliegend, daß bei mißgebildeten Spermien eine Beziehung zwischen einer abweichenden Chromosomenzahl und dem DNS-Gehalt vorhanden ist, die leichter nachzuweisen ist als bei den phänotypisch normalen Samenzellen. Schon lange wird vermutet, daß den Kopfmißbildungen - nur solche werden im Folgenden als morphologisch abnormale Spermien bezeichnet - Störungen der Spermatogeneseprozesse zu Grunde liegen. So werden die Kopfmißbildungen bei der Hodendegeneration des Bullen auf Defekte in der Chromosomenverteilung während der Meiose zurückgeführt (KNUDSEN 1954, 1958). Solche Zusammenhänge sind auch bei Laboratoriumstieren durch artifizuell erzeugte Störungen der meiotischen Teilungsvorgänge belegt (DÖRING et al. 1972).

Somit erhofft man aus derartigen DNS-Bestimmungen an morphologisch mißgebildeten Spermien Aufschlüsse über die Entstehung solcher Samenzellen und ihre Bedeutung für die Befruchtungsfähigkeit zu erlangen.

Die Ergebnisse der DNS-Messungen an morphologisch abnormalen Spermien sind bisher sehr unterschiedlicher Art. GLEDHILL (1966 b), GLEDHILL und Mitarbeiter (1970) finden keine signifikanten Unterschiede im DNS-Gehalt abnormaler Spermienköpfe im Vergleich zu morphologisch normalen Samenzellen. GLEDHILL (1966 b) weist darauf hin, daß die Entstehungsart entscheidend dafür ist, ob Beziehungen zwischen der Morphologie und dem DNS-Gehalt zu erwarten sind. So halten es HENRICSON und BÄCKSTRÖM (1964) für wahrscheinlich, daß die primären Ursachen defekter Gameten in nicht-chromosomalen Strukturen liegen, z. B. im meiotischen Teilungsapparat und nicht in Chromosomenveränderungen. Bei solchen Mißbildungen

wären DNS-Abweichungen nicht zu erwarten.

Möglicherweise ist dies eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, die andere Autoren im Gegensatz zu den Untersuchungen von GLEDHILL (1966 b, 1970) erzielen.

So werden in Ejakulaten vom Mann mit einem vermehrten Anteil mißgebildeter Spermien sowohl ein verminderter, als auch ein erhöhter DNS-Gehalt pro Zelle ermittelt, wobei Spermien mit amorpher Gestalt einen stark herabgesetzten DNS-Gehalt aufweisen (MEYHÖFER 1963). Die Ursache und die Entstehungsweise der anomalen Spermienköpfe sind in diesem Fall nicht bekannt.

Ein auffallendes statistisches Merkmal des DNS-Gehaltes von Spermienpopulationen mit Kopfmißbildungen ist eine erheblich größere Streuung um den Mittelwert, besonders dann, wenn Spermien mit diploidem Charakter auftreten (MEYHÖFER 1963, STOLLA 1970, BOSSE und MEYHÖFER 1970, BOTZENHARDT 1971, STOLLA und GROPP 1973). Diese Diploidie kann beim Bullen nach SALISBURY und BAKER (1966) spontan in einem Prozentsatz von 0,104 v. H., nach ESNAULT und ORTAVANT (1967) in 0,17 v. H. in Erscheinung treten oder kann artifiziell erhöht sein nach Störung der Spermatogenese durch gewisse Noxen.

2.2.1. Morphologisch abnormale Spermien und ihr DNS-Gehalt nach testikulärer Röntgenbestrahlung

Die Ursache und Entstehungsweise anomaler Spermienköpfe lassen sich durch gewisse Versuchsanordnungen studieren, die eine Aussage über die Art und den Zeitpunkt der Entstehung mißgebildeter Spermienköpfe zulassen.

Hierfür bietet sich die testikuläre Röntgenbestrahlung an, weil die zeitliche Korrelation zwischen dem Einwirken der Noxe, der Auswirkung im Keimepithel und dem vermehrten Auftreten mißgebildeter Spermienköpfe bei dieser Art der Schädigung

gung bei vielen Spezies gut bekannt ist (OAKBERG 1955, LEIDL und BERCHTOLD 1964).

Eine einmalige Röntgenbestrahlung der Testes von Bullen führt zu einer Schädigung der Spermatogonien und einer Störung der Spermatogenese zwischen dem Ende der ersten meiotischen Teilung und dem Abschluß der zweiten meiotischen Teilung (LEIDL 1964). Untersuchungen mit einer Dosis von 500 R an der Spezies Bulle (BOTZENHARDT 1971) ergeben eine Steigerung des Anteiles mißgebildeter Spermien, deren Vorstufen im Pachytän der ersten meiotischen Teilung bestrahlt wurden, auf 15 bis 20 %, davon 8 bis 12 % primäre Kopfmißbildungen.

Der DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermatozoen unterscheidet sich nicht wesentlich in den einzelnen Versuchsperioden. Primäre Kopfmißbildungen, die 40 Tage nach testikulärer Bestrahlung gewonnen und UV-photometrisch untersucht wurden, weisen einen stark erhöhten DNS-Gehalt auf (4,15 bis 5,23 x 10⁻¹² g). Es lassen sich zwei Populationen von Spermien unterscheiden mit einem DNS-Gehalt im haploiden Bereich (3,01 ± 0,22 x 10⁻¹² g) und im diploiden Bereich (6,13 ± 1,23 x 10⁻¹² g).

Das bedeutet, daß bei morphologisch mißgebildeten Spermien zum Teil ein kausaler Zusammenhang zwischen einem anomalen DNS-Gehalt und einer gestörten Morphologie bestehen kann. Aus dem Resultat der DNS-Bestimmung wäre dafür als Ursache eine Störung der Chromosomenverteilung während der Meiose zu suchen (OAKBERG und di MINNO 1960, STOLLA et al. 1973) oder im Falle eines Spermien-DNS-Gehaltes von diploidem Charakter das Ausbleiben einer meiotischen Teilung (LEIDL et al. 1971 a).

2.2.2. Genetisch bedingte, morphologisch mißgebildete Spermien und ihr DNS-Gehalt

Die durch die DNS-Bestimmung an mißgebildeten Bullenspermien aufgezeigten Zusammenhänge zwischen Meiosestörungen, chromosomalen Anomalien der Spermiovorstufen und der Morphologie reifer Samenzellen konnten durch Untersuchungen an Spermien der F_1 -Generation aus der Labormaus (*M. musculus*) und der Tabakmaus (*M. poschiavinus*) bestätigt werden.

Die männlichen Tiere dieser Kreuzungsgeneration sind dadurch charakterisiert, daß im Gegensatz zu der fast konstanten Euploidie der Parentalstämme mehr als 50 % der sekundären Spermatozyten eine genetisch bedingte Aneuploidie zeigen. Diese sind durch eine chromosomale Fehlverteilung der Homologen auf die Tochterzellen während der Meiose bedingt (GROPP et al. 1970, TETTENBORN und GROPP 1970). Die exzessiv aneuploiden Spermatozyten II mit bis zu fünf fehlenden bzw. zusätzlichen Chromosomen (TETTENBORN und GROPP 1970) können sich zum Teil zu reifen, morphologisch unauffälligen, aber aneuploiden Spermien weiter entwickeln. Als Beweis dafür dient die gegenüber den Elterngenerationen vergrößerte Streuung des Feulgen-DNS-Gehaltes (DÖRING et al. 1972) und des UV-photometrisch gemessenen DNS-Gehaltes von phänotypisch normalen Spermatozoen (STOLLA und GROPP 1972, 1973). Die auf Grund der veränderten DNS-Werte vermutete Existenz chromosomal unbalancierter Spermien im Ejakulat wurde durch Rückkreuzungsversuche von F_1 -Hybriden mit Weibchen von *M. musculus* bewiesen. Dabei entstehen 50 % und mehr aneuploide Zygoten, die auf eine Befruchtung durch aneuploide Spermien zurückzuführen sind, jedoch frühembryonal absterben und der intrauterinen Resorption anheim fallen (GROPP 1973, GROPP et al. 1973).

Die Untersuchungen an den männlichen F_1 -Hybriden aus *M. musculus* und *M. poschiavinus* zeigen darüberhinaus, daß die für diese Spezies typischen Chromosomenaberrationen der Spermiovorstufen das vermehrte Auftreten morphologisch mißgebildeter

Samenzellen verursachen (DÖRING et al. 1972, STOLLA und GROPP 1973). Die Mißbildungsrate ist im Vergleich zu den Elterngenerationen signifikant erhöht. Die DNS-Werte dieser mißgebildeten Spermien besitzen eine bedeutend größere Streuung als die phänotypisch unauffälligen Samenzellen derselben Tiere. Es lassen sich wiederum zwei Populationen an Spermien mit unterschiedlichen DNS-Werten differenzieren, wobei sich der DNS-Gehalt der einen Gruppe im haploiden Bereich ($3,02 \pm 0,42 \times 10^{-12}$ g), der der anderen sich im diploiden Bereich ($6,11 \pm 0,73 \times 10^{-12}$ g) bewegt (STOLLA und GROPP 1973).

2.2.3. Schlußfolgerung: Beziehung zwischen Meiosestörungen, Teratospermie und DNS-Gehalt

Gewisse Noxen, wie z. B. Röntgenstrahlen und genetische Faktoren, führen zu Meiosestörungen, die sich im Ejakulat in einer Teratospermie manifestieren (BOTZENHARDT 1971, DÖRING et al. 1972, STOLLA und GROPP 1973). Ein hoher Prozentsatz der auf die gestörten meiotischen Prozesse zurückzuführenden mißgebildeten Spermien ist gekennzeichnet durch einen anomalen DNS-Gehalt.

Es ist noch unklar, ob es sich dabei um eine spezifische Erscheinung nach Röntgenbestrahlung oder nach Einwirken eines genetischen Faktors, wie bei den F_1 -Hybriden aus *M. musculus* und *M. poschiavinus*, handelt. Untersuchungen analoger Zusammenhänge an mißgebildeten Spermienköpfen, die durch andere Noxen erzeugt werden, fehlen bis jetzt.

In Ejakulaten mit Teratospermie können auch die morphologisch normalen Spermien geschädigt sein, d. h. Träger von Chromosomenanomalien sein, was im Falle der F_1 -Hybriden aus *M. musculus* und *M. poschiavinus* bewiesen ist (DÖRING et al. 1972, STOLLA und GROPP 1972, 1973). Möglicherweise ist es eine Erklärung dafür, daß, wie man bereits aus der Empirie

weiß und Untersuchungen am Schwein und Kaninchen zeigen (LEIDL et al. 1971 b), Ejakulate mit einem erhöhten Prozentsatz mißgebildeter Spermien schlecht oder nicht befruchten, obwohl eine ausreichende Anzahl morphologisch normaler Spermatozoen vorhanden ist.

Vor allem in klinischer Hinsicht ist von großer Bedeutung, daß chromosomal unbalancierte Spermien zwar befruchten können, jedoch durch einen frühembryonalen Fruchttod zu einer Verschlechterung der Fertilität führen können (GROPP 1973, GROPP et al. 1973). So wird bei Frauen eine erhöhte Abortneigung festgestellt, wenn sie von Männern schwanger wurden, deren Ejakulate vermehrt mißgebildete Spermien enthalten. Ursächlich wird eine Veränderung des chromosomalen Status der Spermatozoen angenommen (MEY-HÖFER 1963).

Die Anwesenheit chromosomal unbalancierter Samenzellen im Sperma kann durch die UV-photometrische DNS-Bestimmung nachgewiesen werden, und zwar durch eine im Vergleich zu den physiologischen Werten erhöhte Standardabweichung.

Der Mittelwert des DNS-Gehaltes einer solchen Spermienpopulation braucht nicht notwendigerweise gegenüber physiologischen Samenzellen verändert zu sein. Bei reinen chromosomalen Verteilungsstörungen bleibt der Mittelwert gleich, nur die Streuung wird größer.

3. Ermittlung des DNS-Gehaltes von Spermien

Die von CASPERSSON (1936) entwickelte Methode der Cyto-spektrophotometrie zur qualitativen und quantitativen Messung organischer Verbindungen in einzelnen Zellen ist die einzige standardisier- und reproduzierbare Methode, den absoluten DNS-Gehalt einer Samenzelle zu ermitteln.

Mit Hilfe der Extinktionsmessung im ultravioletten Spektralbereich läßt sich der DNS-Wert eines Spermiums in der Größe von 10^{-12} g nachweisen.

Zur Methodik und Anwendung der UV-Mikrospektrophotometrie sei auf die Literatur verwiesen (SANDRITTER 1958, LANG 1965, STOLLA 1968).

Der große Vorteil der UV-Mikrospektrophotometrie ist die Möglichkeit, einzelne, isoliert liegende Zellen unter dem Mikroskop analysieren zu können, und zwar, im Gegensatz zu anderen Methoden, Zellen unbehandelter Präparate, wodurch die DNS chemisch oder strukturell nicht verändert wird.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

Als Versuchstiere dienten 5 Fleckviehbullen im Alter von 11 bis 14 Monaten mit einem Körpergewicht von 380 kg bis 440 kg. Alle Bullen befanden sich in gutem Allgemeinzu- stand, waren frei von Krankheiten und wurden unter gleichen Bedingungen (Stallklima, Fütterung) gehalten. Regelmäßig über die gesamte Versuchsperiode wurden sie zweimal wöchentlich zur Spermagewinnung herangezogen. Die Spermaqualität war vor Einwirkung der Wärmenoxe physiologisch.

Tabelle 5: Alter, Körpergewicht und Spermaqualität (1 Ejakulat) der Versuchstiere vor Versuchsbeginn

Bulle	Alter (Monate)	KGW (kg)	S p e r m a q u a l i t ä t			
			Vorwärtsbe- wegung (%)	Dichte 10 ⁶ /mm ³	echte Kopf- mißbild.(%)	Mißbild. ges.(%)
A	11	400	65	1,30	0,0	4,3
B	14	380	65	0,92	2,0	6,6
C	14	440	60	0,99	2,3	4,6
D	13	430	60	1,32	1,3	7,6
E	13	430	75	0,87	3,0	6,3

2. Versuchsanordnung und -durchführung

Die Hoden der Bullen wurden nach der von ELAZAB (1966) beschriebenen Methode mittels warmen Wassers erwärmt. Da die Hoden vertikal von der Bauchwand herabhängen, ließen sie sich als Gesamtes gut von einem wasserdichten Beutel aus festem Gummi-Segeltuchmaterial (Camping-Wasserbeutel) so umgeben, daß zwischen Skrotum und Beutel ein zwei bis drei Zentimeter großer Zwischenraum für das erwärmte Wasser frei blieb. Die Fixierung des Beutels wurde durch eine Gurtvorrichtung gewährleistet, die in Form eines "T" um den Rücken und nach caudal über den Schwanzansatz verlief.

Eine Umwälzpumpe mit eingebautem Thermostaten und einer Heizvorrichtung beförderte das Wasser durch Plastikschläuche von unten in den Beutel hinein und über ein Ansaugventil von oben wieder zur Umwälzpumpe zurück.

Die Temperatur des Wassers im Beutel wurde während der gesamten Behandlungsdauer von 4 1/2 Stunden auf konstant 43 ° C gehalten. Die Temperaturschwankung zu Beginn des Versuches bewegte sich im Bereich von $\pm 0,1$ ° C.

Die Tiere wurden während der Hodenerwärmung im Notstand fixiert und vorsorglich gegen heftige Abwehrbewegungen mit 0,25 ml Xylazin-Hydrochlorid pro 100 kg Körpergewicht (Rompun, Bayer Leverkusen) sediert.

3. Spermagewinnung und Sperma beurteilung

Die Samengewinnung erfolgte mit Hilfe der künstlichen Scheide am Phantom. Die Untersuchung der Spermaqualität und ihre Beurteilung nach GÖTZE (1949) wurde unmittelbar nach der Gewinnung durchgeführt.

Es wurde von sämtlichen Bullen Sperma in bestimmten Zeitabständen gewonnen und zur Messung auf den DNS-Gehalt verwendet:

S_1 = Sperma vor der Erwärmung (Kontrolle)

S_2 = Sperma, erhalten 20 Tage nach der Wärmenoxe

S_3 = Sperma, erhalten 30 Tage nach der Wärmenoxe

S_4 = Sperma, erhalten 40 Tage nach der Wärmenoxe

Bei einer Dauer des Keimepithelzyklus von 13,5 Tagen und der Nebenhodenpassage von 8 - 10 Tagen befanden sich zum Zeitpunkt der Störung der Spermatogenese durch die gesetzte Wärmenoxe die Spermien " S_2 " als Spermatiden in der Spermientransformation, die Spermien " S_3 " im Stadium der zweiten meiotischen Teilung und die Spermien " S_4 " im Pachytän der ersten meiotischen Teilung.

Zur UV-photometrischen Messung des DNS-Gehaltes wurden aus je einem Ejakulat pro Bulle ausgewählt:

Aus 2 Ausstrichen der Kontrolle 50 morphologisch normale Spermien, aus 3 Ausstrichen der Versuchsperioden 20, 30 und 40 Tage nach Erwärmung der Hoden 50 morphologisch normal aussehende und 50 Spermien mit primären Kopfmißbildungen. Auf diese Weise wurden etwaige Doppelmessungen in einem Präparat vermieden.

4. Herstellung der Präparate

Die Ejakulate wurden sofort einer Reinigungszentrifugierung über 5 Minuten bei 1500 U/min unterzogen. Nach Dekantierung der überstehenden Spermaflüssigkeit und Hinzugabe von physiologischer Kochsalzlösung wurde der Inhalt des Zentrifugenglases gut aufgerührt und erneut bei 2000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Letzterer Arbeitsgang erfolgte dreimal. Die so gereinigten und vom Samenplasma getrennten Spermien (Sediment) wurden darauf mit einer entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung derart verdünnt, daß sie beim Ausstreichen auf geschliffene Quarzobjektträger isoliert zu liegen kamen. Nach Lufttrocknung bei Zimmertemperatur erfolgte eine Überschichtung des Präparates mit wasserfreiem Glycerin (Brechungsindex 1,455 bei 20 ° C), eine Abdeckung mit geschliffenem Quarzdeckglas und eine Umrandung mit Eukitt.

5. Arbeitsweise des verwendeten Spektralphotometers

Die Ermittlung des DNS-Gehaltes wurde mit dem Universalmikrospektrophotometer (UMSP I, Zeiss) ausgeführt. Die Messungen erfolgten bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 313 nm. Die Größe der Meßblende in Objektebene war eingestellt auf 0,5 μ , der Durchmesser der Leuchtfeldblende auf 2,5 μ . Für die automatisch ablaufende Registrierung wurde das mikroskopische Präparat von einem Spezialtisch mit der Geschwindigkeit von 40 μ pro Minute verschoben. Der Abstand der Meßlinien (Zeilenhub) bei der hier angewandten mäanderförmigen Absuchung der Spermienköpfe (Scanning-Methode) betrug 0,5 μ .

Die Meßobjekte wurden bei sichtbarem Licht (546 nm) mittels eines Fadenkreuzes so eingestellt, daß nach Abtastung des Spermienkopfes der Meßvorgang von selbst abgebrochen wurde. Damit blieben Hals, Mittelstück und Schwanz des Spermiums von der Messung ausgespart.

Synchron zum Meßablauf notierte der Schreiber bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mm pro Minute die Transmissionskurve und den Integralwert der Extinktion auf Diagrammpapier. Ein Ablesen der Gesamttextinktion, ausgedrückt in Arbeitseinheiten (A.E.), war sofort möglich.

Nähere Einzelheiten über den Aufbau und die Arbeitsweise des zur Messung auf den DNS-Gehalt der Spermien verwendeten Universalmikrospektrophotometers (UMSP I, Zeiss) sind zu finden bei STOLLA (1968).

6. Berechnung des DNS-Gehaltes

Nach der von SANDRITTER (1958) aufgestellten Formel

$$M = (0,92 \sum E \text{ 260 nm} - 0,75 \sum E \text{ 280 nm} - 0,25 \sum E \text{ 313 nm}) \times 10^{-12} \text{ g}$$

ließ sich der absolute DNS-Gehalt errechnen.

7. Statistik

Für die statistische Berechnung der Signifikanzen der Differenzen von Mittelwerten und der Varianzverhältnisse wurden die einfache Varianzanalyse, die zweifaktorielle Varianzanalyse, der Tukey-Test und der F-Test verwendet (MUDRA 1958, SNEDECOR 1962, WEBER 1972).

Alle Prozentwerte wurden für die statistischen Berechnungen transformiert.

IV ERGEBNISSE

1. Spermawerte

Die 5 Versuchsbullen zeigen in den einzelnen Versuchsstadien übereinstimmende Spermabeschaffenheit, so daß die Ergebnisse zusammengefaßt besprochen werden können (Tabellen: 6, 7, 8, 9).

Die Dichte der Ejakulate aller Bullen ist 20, 30 und 40 Tage nach lokaler, testikulärer Erwärmung durch eine starke Abnahme gegenüber den Kontrollwerten gekennzeichnet, ebenso verschlechtert sich die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in allen Versuchsperioden (Tabelle: 6, 7, 8).

Die Morphologie der Spermatozoen und der prozentuale Anteil von Mißbildungen ist im Verlauf der Untersuchungen großen Veränderungen unterworfen. Besonders ausgeprägt ist ein deutlicher Anstieg primärer Mißbildungen in allen Versuchsperioden (Tabelle: 6, 7, 9; Abbildung 2). Faßt man die Ejakulate aller Bullen 20, 30 und 40 Tage nach lokaler Hodenerwärmung zusammen, so erfolgt eine statistisch signifikante Erhöhung der Mißbildungsrate primärer Kopf- und Schwanzmißbildungen ($P < 0,01$ bzw. $0,05$) im Vergleich zu den Werten der Kontrolle (Tabelle: 9).

Die Kopfformen der primären Mißbildungen sind in den einzelnen Versuchsperioden verschieden gestaltet. Während 20 Tage nach Erwärmung der Hoden fast ausschließlich birnenförmige Spermienköpfe auftreten, besitzen die abnormalen Spermien 30 und 40 Tage post operationem verschiedenartiges Aussehen (Abbildung 1).

Abbildung 1: Formen von Kopfmißbildungen während verschiedener Versuchsperioden nach lokaler, testikulärer Wärmeeinwirkung

Versuchsstadium	Kopfformen		
Kontrolle			
20 Tage nach Erwärmung			
30 Tage nach Erwärmung			
40 Tage nach Erwärmung			

Tabelle 6: Spermawerte der Bullen in den verschiedenen Versuchsperioden (Teil I)

	B u l l e A				B u l l e B				B u l l e C			
	K	20	30	40	K	20	30	40	K	20	30	40
Volumen (ml)	2,0	2,4	3,2	1,5	1,8	5,8	2,0	1,0	2,0	4,5	4,0	4,5
Vorwärtsbeweg. (%)	65	30	55	40	65	10	20	60	60	-	x	5
Dichte ($10^6/\text{mm}^3$)	1,3	0,61	0,36	0,12	0,92	0,76	0,25	0,12	0,99	0,04	0,04	0,01
Leb.-Tot-Färbg. (%)	68	25	54	46	67	33	24	68	68	-	x	8
E. Kopfmießb. (%)	0,0	55,0	39,0	12,3	2,0	42,0	18,0	6,3	2,3	31,3	-	x
E. Schwanzmißb. (%)	2,0	12,0	7,0	4,3	3,3	11,0	18,0	8,0	1,0	12,0	-	x
Krümmlinge (%)	2,3	3,0	1,3	3,0	0,0	10,3	0,0	4,0	0,0	0,0	-	x
Lose Köpfe (%)	0,0	13,0	4,0	5,0	1,3	12,3	1,3	2,0	1,3	17,3	-	x
Abgel. Kopfkappen (%)	0,0	0,6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	x
Gesamtmißbild. (%)	4,3	83,6	52,3	24,6	6,6	75,6	37,3	20,3	4,6	60,6	-	x
												14,3

K = Kontrolle

20 = 20 Tage nach Erwärmung

x = Kein Wert infolge hohen Bakterien- und Zellgehaltes

E. Kopfmießb. = Echte Kopfmießbildungen

E. Schwanzmißb. = Echte Schwanzmißbildungen

30 = 30 Tage nach Erwärmung

40 = 40 Tage nach Erwärmung

Tabelle 7: Spermawerte der Bullen in den verschiedenen Versuchsperioden (Teil II)

	B u l l e D				B u l l e E			
	K	20	30	40	K	20	30	40
Volumen (ml)	3,5	2,3	4,0	3,5	2,5	5,0	2,0	8,5
Vorwärtsbewegung (%)	60	20	45	50	75	0	0	70
Dichte ($10^6/\text{mm}^3$)	1,32	0,22	0,18	0,63	0,87	0,03	0,18	0,2
Leb.-Tot-Färbg. (%)	68	27	50	45	77	0	0	55
E. Kopfmießb. (%)	1,3	65,3	11,3	18,3	3,0	67,0	17,0	12,3
E. Schwanzmißb. (%)	1,0	3,0	2,3	11,3	1,0	11,3	11,3	12,0
Krümmlinge (%)	0,0	0,0	3,6	14,3	0,0	0,0	2,6	5,3
Lose Köpfe (%)	5,3	1,3	0,0	4,0	2,3	6,3	0,0	1,3
Abgel. Kopfkappen (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0
Gesamtmißbild. (%)	7,6	69,6	17,2	47,9	6,3	84,9	30,9	30,9

K = Kontrolle

20 = 20 Tage nach Erwärmung

E. Kopfmießb. = Echte Kopfmießbildungen

E. Schwanzmißb. = Echte Schwanzmißbildungen

30 = 30 Tage nach Erwärmung

40 = 40 Tage nach Erwärmung

Tabelle 8: Zusammenfassung der Spermawerte aller Versuchstiere in den verschiedenen Versuchsperioden (pro Versuchsperiode 5 Bullen, $\bar{x} \pm s$)

Versuchsperiode	Bullen n	Volumen (ml) $\bar{x} \pm s$	Vorwärtsbeweg- lichkeit (%) $\bar{x} \pm s$	Dichte $10^6/\text{mm}^3$ $\bar{x} \pm s$	Lebend-Tot-Färbung ungefärbte Sp. (%) $\bar{x} \pm s$
I Kontrolle	5	2,36 $\pm$ 0,68	65,10 $\pm$ 6,12	1,083 $\pm$ 0,21	69,65 $\pm$ 3,87
II 20 Tage nach Erwärmung	5	4,0 $\pm$ 1,57	19,30 $\pm$ 10,0	0,335 $\pm$ 0,33	28,25 $\pm$ 3,53
III 30 Tage nach Erwärmung	5	3,04 $\pm$ 1,0	34,20 $\pm$ 17,8	0,208 $\pm$ 0,12	42,20 $\pm$ 16,3
IV 40 Tage nach Erwärmung	5	3,80 $\pm$ 2,99	42,9 $\pm$ 25,0	0,217 $\pm$ 0,24	41,98 $\pm$ 22,3

Differenzen:

a) Dichte:

I : II, I : III, I : IV ($P < 0,01$)

c) Vorwärtsbeweglichkeit:

I : II ($P < 0,01$); I : III ($P < 0,05$)

b) Lebend-Tot-Färbung:

I : II ($P < 0,01$); I : III, I : IV ($P < 0,05$)

Tabelle 9: Zusammenfassung der Morphologie der Ejakulate aller Versuchstiere in den verschiedenen Versuchsperioden (pro Versuchsperiode 5 Bullen, $\bar{x} \pm s$)

Versuchsperiode	Bullen n	Primäre Mißbildungen (%)		Sekundäre Mißbildungen (%)		K.K. $\bar{x} \pm s$
		Kopf $\bar{x} \pm s$	Schwanz $\bar{x} \pm s$	Kr. $\bar{x} \pm s$	L.K. $\bar{x} \pm s$	
I Kontrolle	5	2,1 $\pm$ 0,70	1,6 $\pm$ 1,1	2,3	2,3	0,0
II 20 Tage nach Erwärmung	5	52,1 $\pm$ 15,82	9,5 $\pm$ 3,86	6,1 $\pm$ 5,16	9,0 $\pm$ 3,10	0,4 $\pm$ 0,22
III 30 Tage nach Erwärmung	5	20,5 $\pm$ 12,14	8,7 $\pm$ 6,67	2,4 $\pm$ 1,15	2,5 $\pm$ 1,91	1,0
IV 40 Tage nach Erwärmung	5	10,9 $\pm$ 4,79	7,3 $\pm$ 3,51	4,7 $\pm$ 5,15	2,9 $\pm$ 1,48	0,0

Differenzen:

a) primäre Kopfmißbildungen:

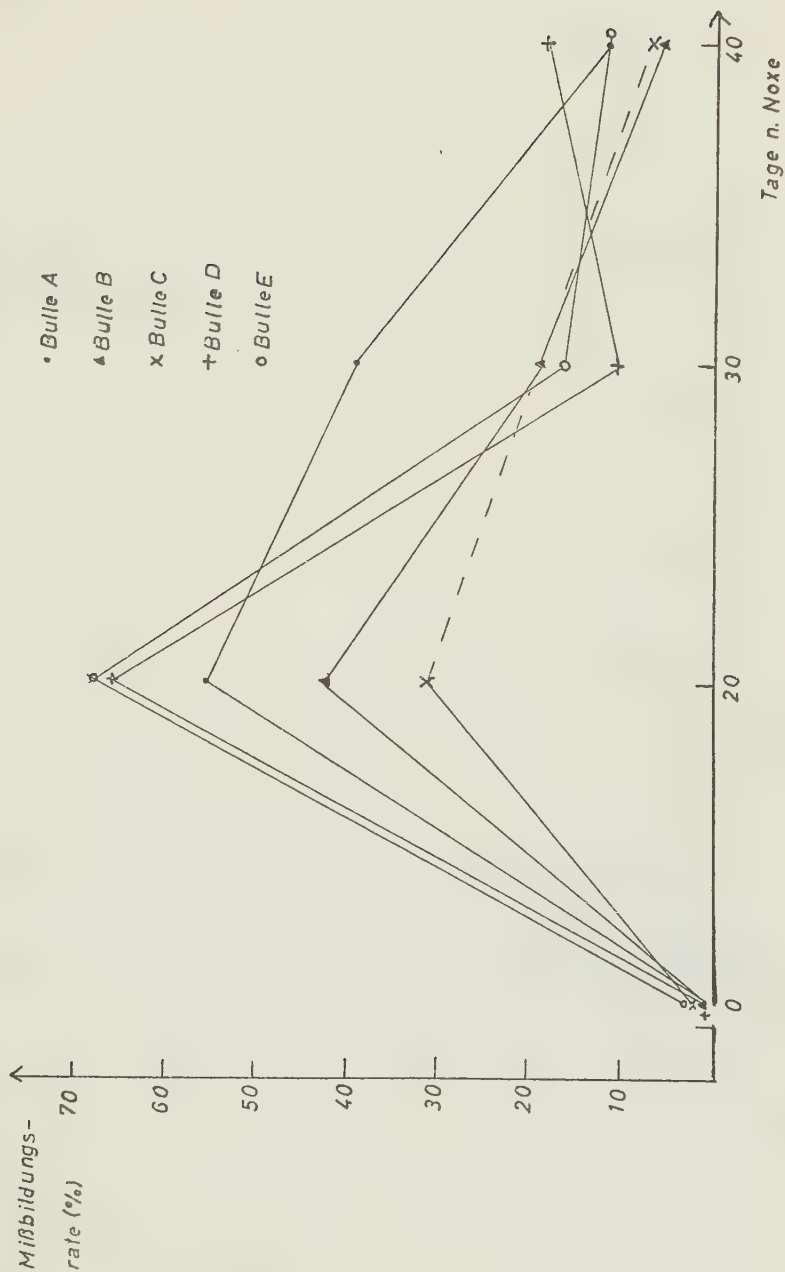
I : II, I : III, I : IV, II : IV ($P < 0,01$)
II : III, III : IV ($P < 0,05$)

b) primäre Schwanzmißbildungen:

I : II, I : IV ($P < 0,01$)
I : III ($P < 0,05$)

Zeichenerklärung: Kr. = Krümmlinge, L.K. = lose Köpfe, K.K. = Kopfkappen (abgelöst)

Abbildung 2: Anteil primärer Kopfmißbildungen nach lokaler, testikulärer Erwärmung



2. DNS-Gehalt

2.1. Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes in der Kontrollperiode

Tabelle 10: Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes
($\times 10^{-12}$ g) der Versuchsbullen in der Kontrolle

Bulle	$\bar{x} \pm s$	B	C	D	E
A	$2,99 \pm 0,12$	$- 0,11^{**}$	$- 0,09^{**}$	$- 0,12^{**}$	$- 0,06$
B	$3,10 \pm 0,17$		0,02	$- 0,01$	0,05
C	$3,08 \pm 0,14$			$- 0,03$	0,03
D	$3,11 \pm 0,14$				0,06
E	$3,05 \pm 0,10$				

* * $P < 0,01$

Der Vergleich des mittleren DNS-Gehaltes in der Kontrollperiode zwischen den 5 Versuchsbullen ergibt individuell bedingte Unterschiede (Tabelle 10). Bulle A weicht im Mittelwert des DNS-Gehaltes signifikant ($P < 0,01$) vom Wert der Bullen B, C und D ab.

2.2. DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermien in den verschiedenen Versuchsperioden

Der durchschnittliche DNS-Gehalt aller 250 untersuchten, von 5 Bullen stammenden Spermien (Tabelle 11), die während ihrer Transformationsphase der Wärmeeinwirkung ausgesetzt waren und 20 Tage später im Ejakulat erschienen, ist gegenüber der Kontrollperiode deutlich vermindert ($P < 0,01$). Bei den Spermien dagegen, die 30 und 40 Tage nach der Erwärmung gewonnen wurden, war keine Änderung zu beobachten. Betrachtet man die mittleren DNS-Werte ($n = 50$) der einzelnen Bullen der 20-Tage-Versuchsperiode, so ist keine einheitliche Tendenz festzustellen. Während bei 3 Bullen (A, B und C) eine Verminderung im DNS-Gehalt der Spermien eintritt, ist bei 2 Tieren (D und E) ein Anstieg gegenüber ihren Kontrollwerten festzustellen. Ein ähnliches, uneinheitliches Verhalten zeigen auch die Spermien bei den einzelnen Bullen, wenn die Vorstufen dieser Samenzellen in der ersten bzw. zweiten meiotischen Teilung geschädigt wurden und 30 bzw. 40 Tage nach der Noxe im Ejakulat zu finden waren. Eine gleichartige Veränderung des DNS-Gehaltes morphologisch normaler Spermien ist demnach in den einzelnen Versuchsperioden nach Schädigung des Germinativums nicht festzustellen, vielmehr bestehen deutliche Unterschiede zwischen den hier verwendeten Bullen.

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse kann eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Wärmenoxe und Versuchstiere nachgewiesen werden. Signifikante individuelle Unterschiede der durchschnittlichen DNS-Werte ($P < 0,05$ bzw. $0,01$; Tabelle 11), wie sie auch in Abschnitt 2.1. beschrieben wurden, sind auch bei dieser Auswertung zu finden.

Tabelle 11: DNS-Gehalt ($g \times 10^{-12}$; $\bar{x} \pm s$) normaler Bullenspermien vor und nach testikulärer Erwärmung

	Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle D	Bulle E	gesamt
Kontrolle	2,99 $\pm$ 0,12	3,10 $\pm$ 0,17	3,08 $\pm$ 0,14	3,11 $\pm$ 0,14	3,05 $\pm$ 0,10	3,06 $\pm$ 0,14
20 Tage n. Erwärmung	2,97 $\pm$ 0,10	2,80 $\pm$ 0,14	2,76 $\pm$ 0,12	3,17 $\pm$ 0,10	3,15 $\pm$ 0,12	2,97 $\pm$ 0,20
30 Tage n. Erwärmung	3,18 $\pm$ 0,17	3,17 $\pm$ 0,12	2,76 $\pm$ 0,28	3,06 $\pm$ 0,12	3,15 $\pm$ 0,10	3,06 $\pm$ 0,23
40 Tage n. Erwärmung	3,14 $\pm$ 0,10	3,11 $\pm$ 0,12	3,05 $\pm$ 0,14	3,01 $\pm$ 0,11	3,07 $\pm$ 0,14	3,07 $\pm$ 0,13
gesamt	3,07 $\pm$ 0,16	3,05 $\pm$ 0,20	2,91 $\pm$ 0,25	3,09 $\pm$ 0,12	3,11 $\pm$ 0,12	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----	-----

$P < 0,05$ --- $P < 0,01$ ---
 Signifikanz der Differenzen der Gruppenmittelwerte
 (Zweifaktorielle Varianzanalyse, Tukey-Test)

2.3. DNS-Gehalt morphologisch abnormaler Spermien in den verschiedenen Versuchsperioden

Pro Bulle wurden aus den Versuchsperioden 20, 30 und 40 Tage nach lokaler, testikulärer Erwärmung je 50 pathologische Spermienköpfe gemessen.

Faßt man alle 250 pro Versuchsperiode untersuchten Spermien zusammen, so ergibt sich ein Anstieg der Werte solcher Samenzellen, deren Vorstufen in der ersten und zweiten meiotischen Teilung durch die Wärmenoxe geschädigt wurden (Tabelle 12). Allerdings ist diese Differenz im Vergleich zu den Kontrollwerten nur im Falle der 30-Tage-Periode signifikant ($P < 0,05$).

Wie schon bei den morphologischen normalen Samenzellen ist auch hier der Effekt der angewandten Wärmenoxe hinsichtlich des DNS-Gehaltes in Abhängigkeit von den verschiedenen Bullen unterschiedlich. Die Wechselwirkung zwischen dem Einfluß der Wärmenoxe und den Versuchstieren ist gesichert ($P < 0,01$).

Die Veränderungen der DNS-Werte jener Spermien, deren Vorstufen in der ersten und zweiten meiotischen Teilung geschädigt wurden und 40 bzw. 30 Tage später im Sperma auftraten, sind im wesentlichen durch eine erhöhte Standardabweichung charakterisiert. Dieser Sachverhalt ist besonders deutlich aus dem Vergleich der Variationskoeffizienten (s%) der normalen und mißgebildeten Spermien in den verschiedenen Versuchsperioden zu ersehen (Abbildung 3).

Die erhöhte Variabilität der DNS-Werte bei den Bullen B, C, D und E ist bedingt durch das Auftreten pathologischer Spermienköpfe mit einem DNS-Gehalt in Höhe diploider Zellen. Als Minimalwert für einen diploiden DNS-Gehalt wurde willkürlich $4,60 \times 10^{-12}$ g pro Spermienkopf festgelegt, da dies etwa dem rechnerischen Mittel zwischen den in dieser Arbeit gemessenen durchschnittlichen haploiden Werten ($3,06 \times 10^{-12}$ g) und den diploiden, also verdoppelten haploiden

Werten entspricht.

Die Analyse der Verteilungskurven von je 250 DNS-Werten morphologisch abnormaler Spermien in den einzelnen Versuchsperioden (Tabelle 13) zeigt, daß in der 30-Tage-Periode 5 Spermien im diploiden DNS-Bereich vorhanden sind, entsprechend 2,84 %, während es 40 Tage nach Erwärmung 4 Spermien sind, entsprechend 1,63 %. Auch nach Eliminierung der Werte im diploiden Bereich sind die Standardabweichungen der Spermien im haploiden Bereich in sämtlichen Versuchsperioden größer als in der Kontrolle ($P < 0,005$). Das gilt auch für die 20-Tage-Periode, in der jedoch keine diploiden Werte registriert wurden.

Abbildung 3: Variationskoeffizient (s%) des DNS-Gehaltes normaler und mißgebildeter Spermienköpfe (5 Bullen, je 50 Spermien)

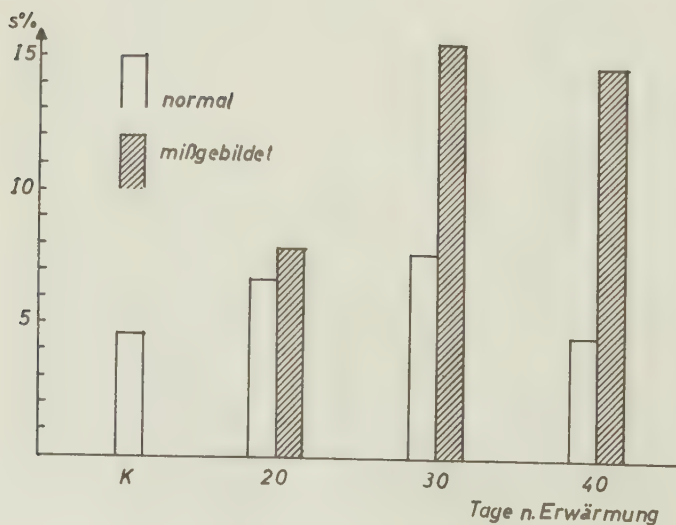


Tabelle 12: DNS-Gehalt ($g \times 10^{-12}$; $\bar{x} \pm s$) abnormaler Bullenspermien nach testikulärer Erwärmung

	Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle D	Bulle E	gesamt
Kontrolle	2,99 $\pm$ 0,12	3,10 $\pm$ 0,17	3,08 $\pm$ 0,14	3,11 $\pm$ 0,14	3,05 $\pm$ 0,10	3,06 $\pm$ 0,14
20 Tage n. Erwärmung	2,95 $\pm$ 0,15	2,86 $\pm$ 0,19	3,08 $\pm$ 0,33	3,17 $\pm$ 0,15	3,17 $\pm$ 0,13	3,04 $\pm$ 0,24
30 Tage n. Erwärmung	3,11 $\pm$ 0,16	3,01 $\pm$ 0,16	3,28 $\pm$ 0,52	3,15 $\pm$ 0,84	3,09 $\pm$ 0,36	3,13 $\pm$ 0,49
40 Tage n. Erwärmung	3,11 $\pm$ 0,12	3,05 $\pm$ 0,56	3,05 $\pm$ 0,13	3,11 $\pm$ 0,52	3,20 $\pm$ 0,65	3,12 $\pm$ 0,46
gesamt	3,04 $\pm$ 0,16	3,00 $\pm$ 0,33	3,12 $\pm$ 0,33	3,13 $\pm$ 0,50	3,12 $\pm$ 0,38	

P < 0,05 - - - P < 0,01 ———

Signifikanz der Differenzen der Gruppenmittelwerte
(Zweifaktorielle Varianzanalyse, Tukey-Test)

Tabelle 13: Verteilung der DNS-Werte ($g \times 10^{-12}$; $\bar{x} \pm s$) im haploiden und diploiden Bereich von morphologisch abnormalen Bullenspermien nach der Wärmenoxe

	Versuchsstadium	Morphologie	Spermien			
			n	im haploiden Bereich $\bar{x} \pm s$	im diploiden Bereich n	$\bar{x} \pm s$
I	Kontrolle	normal	250	$3,06 \pm 0,14$	-	-
II	20 Tage n. Erwärmung	abnormal	250	$3,04 \pm 0,24$	-	-
III	30 Tage n. Erwärmung	abnormal	245	$3,06 \pm 0,23$	5	$6,09 \pm 2,75$
IV	40 Tage n. Erwärmung	abnormal	246	$3,05 \pm 0,19$	4	$6,34 \pm 0,24$

Vergleich der Standardabweichungen (F-Test):

I : II
 I : III
 I : IV

} $p < 0,005$

V DISKUSSION

Wie die Erfahrungen aus der künstlichen Besamung zeigen, setzen Ejakulate mit einem erhöhten Anteil primär mißgebildeter Spermien das Befruchtungsvermögen eines Vater-tieres herab, obwohl eine ausreichende Zahl morphologisch normal erscheinender Samenzellen vorhanden ist. Hierbei sollen nicht die pathologisch geformten Spermien primäre Ursache einer Befruchtungsstörung sein, sondern im Auftreten eines bestimmten Anteiles mißgebildeter Spermien ist ein Hinweis gegeben, daß unter Umständen auch die übrigen Spermatozoen in einem Ejakulat geschädigt sein können (LEIDL et al. 1971 b).

Untersuchungen an F_1 -Hybriden bestimmter Mäusekreuzungen (*M. musculus* x *M. poschiavinus*) und Versuche mit lokaler testikulärer Röntgenbestrahlung bei Bullen zeigen, daß diese Störungen der spermatogenetischen Prozesse eine Steigerung des Prozentsatzes an Kopfmißbildungen hervorrufen (DÖRING et al. 1972, LEIDL und BERCHTOLD 1964, BOTZENHARDT 1971), die in ihrem DNS-Gehalt, vermutlich infolge chromosomaler Imbalancen, gestört sind (STOLLA und GROPP 1973, STOLLA et al. 1973). Es ist nachgewiesen, daß auch phänotypisch unveränderte Spermien Träger von Chromosomenaberrationen sein können (DÖRING et al. 1972, STOLLA und GROPP 1972, 1973, BOTZENHARDT 1971).

Es stellte sich nun die Frage, ob derartige Erscheinungen spezifisch sind für die Störungsfaktoren "Röntgenstrahlen bzw. genetischer Einfluß" oder ob eine ähnliche Reaktion des Germinativums auch durch andere Noxen hervorgerufen ist.

In dieser Arbeit wurde zur Beeinträchtigung der Spermatogenese beim Bullen die lokale, testikuläre Wärmeapplikation verwendet. Diese Methodik ist bereits in früheren Versuchen eingesetzt und überprüft worden (ELAZAB 1966). Die Ermitt-

lung des DNS-Gehaltes morphologisch normaler und abnormaler Spermien erfolgte mit dem Universalmikrospektrophotometer (UMSP I, Zeiss) im ultravioletten Licht (STOLLA 1968).

Im Spermioogramm der 5 Versuchstiere konnte eine einheitliche Tendenz in den Veränderungen der Morphologie und der Dichte festgestellt werden (Tabelle 6, 7, 8, 9). Die Stärke der Reaktion bzw. die Auswirkung im Ejakulat war jedoch von Bulle zu Bulle verschieden. So stieg der Anteil primärer Kopfmißbildungen 20 Tage nach lokaler Hodenerwärmung auf 31,3 bis 67 Prozent an. Das morphologische Bild war in dieser Zeit hauptsächlich geprägt von birnenförmigen Spermienköpfen. In den Versuchsperioden 30 und 40 Tage nach Erwärmung fielen zwar die prozentualen Anteile primärer Kopfmißbildungen wieder ab, jedoch betrugen sie immer noch 11,3 bis 39 Prozent der Spermienpopulation, die in der zweiten Meiose geschädigt wurde, bzw. 6,3 bis 18,3 Prozent in den Ejakulaten, deren Spermienvorstufen in der ersten Meiose der Noxe ausgesetzt waren. Die morphologischen Anomalien zeigten in diesen Perioden ein weites Spektrum (Abbildung 1). Es bestätigte sich wiederum, daß die Spermientransformation ein sehr thermosensibles cytologisches Stadium der Spermatogenese ist (ELAZAB 1966). Die Einwirkung der Noxe während der ersten und zweiten meiotischen Teilung hatte ebenso eine Teratospermie, jedoch geringeren Grades, zur Folge. Auch die Auswirkungen auf die Dichte der Ejakulate zeigte, daß in allen hier untersuchten Abschnitten der Spermatogenese eine sehr ausgeprägte Hemmung oder Störung in der Bildung von Samenzellen eintritt, die bei intensiverer Einwirkung die Tendenz zur Azoospermie erkennen läßt (ELAZAB 1966).

Die beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Bullen können verschiedene Ursachen haben. An erster Stelle ist an einen Fehler methodischer Art zu denken, zumal die Wärmexose im Vergleich zu Röntgenstrahlen schwer zu standardisieren ist. Anatomisch-morphologische und funktionelle Unterschiede der Testes (Hautdicke, Blutzirkulation, Hochziehen der Hoden)

und eventuell psychische Merkmale der Versuchstiere können die Auswirkungen einer lokalen Wärmeapplikation beeinflussen.

In zweiter Linie müssen auch individuelle Unterschiede im Ansprechen auf die Noxe beachtet werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Höhe der applizierten Temperatur. STEINBERGER und DIXON (1959) konnten nämlich bei Ratten beobachten, daß bei einer intratestikulär gemessenen Erwärmung der Hoden auf 43 ° C nur Veränderungen in der Morphologie der Spermien auftraten. Eine intratestikuläre Temperaturerhöhung auf 45 ° C dagegen verursachte auch Störungen in den meiotischen Teilungsprozessen.

Ähnlich den Ergebnissen anderer Untersucher bei verschiedenen Spezies (LEIDL und STOLLA 1969, STOLLA 1970, BOTZENHARDT 1971, STOLLA 1972) wurden Unterschiede im DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermien der Kontrollperiode gefunden. Die Werte lagen in der Größenordnung von 2,99 bis 3,11 x 10⁻¹² g pro Samenzelle (Tabelle 10), wobei Bulle A gegenüber 3 anderen Bullen (B, C und D) einen signifikant niedrigeren DNS-Wert (P < 0,05) besaß. Es war auffallend, daß sich die Werte zwar in der gleichen Größenordnung bewegten, insgesamt aber gegenüber früheren Untersuchungen an Bullenspermien (STOLLA 1968, BOTZENHARDT 1971) vermindert waren. Die Ursache dafür ist von der Methodik der UV-Photometrie und dem Tiermaterial her nicht zu erklären. Möglicherweise ist dieser niedrigere Ausgangswert dadurch bedingt, daß unter den Versuchstieren ein Individuum (Bulle A) vertreten war, dessen Durchschnitts-DNS-Gehalt am äußersten linken Schenkel der möglichen Variation lag.

Die Ermittlung des DNS-Gehaltes phänotypisch normaler Spermien in den verschiedenen Versuchsperioden war auch in der Hinsicht von besonderem Interesse, ob sich der DNS-Gehalt solcher Spermien in einem Ejakulat mit vermehrter Teratospermie ändert, zumal Hinweise bestehen, daß auch morphologisch vollkommen unauffällige Samenzellen chromosomal ge-

schädigt sein können (STOLLA und GROPP 1972).

Bei der Gesamtbetrachtung aller DNS-Werte morphologisch normaler Spermien pro Versuchsperiode zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen, daß die Spermien, deren Vorstufen in der Transformation geschädigt wurden, in ihrem DNS-Gehalt gegenüber der Kontrolle herabgesetzt waren, während dies bei phänotypisch normalen Spermatozoen aus den Versuchsperioden 30 und 40 Tage nach Erwärmung nicht der Fall war. Vergleicht man aber die Auswirkung der testikulären Erwärmung in der Transformationsphase getrennt nach Bullen, so sah man ein unterschiedliches Verhalten im DNS-Mittelwert ($n = 50$). Die Bullen D und E zeigten eine Erhöhung, Bulle A veränderte sich nicht und die übrigen Bullen fielen in ihrem Spermien-DNS-Gehalt gegenüber dem Kontrollwert ab. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten der Versuchstiere ist schwerlich zu geben, da in diesem Abschnitt der Spermatogenese keine strukturelle oder chemische Änderung der DNS mehr stattfindet (GLEDHILL 1966 a, 1966 b; LAVON et al. 1971). GLEDHILL und Mitarbeiter (1966) berichten zwar über cytochemische Veränderungen des DNS-Proteinkomplexes in der Spermientransformation, doch reicht dieses Phänomen nicht aus, so große individuelle Unterschiede fundieren zu können. Eventuell findet durch eine Wärmeschädigung in der Transformationsphase nur eine "relative DNS-Veränderung" statt, die in der sehr thermosensiblen Dehnungsphase des Zellkernes (ROOSEN-RUNGE 1955, ORTAVANT 1958) infolge Auflösung des Chromatins oder durch Kernpyknose entsteht. Natürlich darf eine unterschiedliche Wärmeempfindlichkeit des Keimepithels der Tiere nicht ausgeschlossen werden, wie die variablen Reaktionen der morphologischen Mißbildungsraten bereits zeigten.

Daß eine individuell unterschiedliche Sensibilität des Germinativums der Bullen gegenüber der Wärmenoxe angenommen werden darf, ging auch aus der statistischen Analyse mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse hervor. Es ergab sich

eine Wechselwirkung ($P < 0,01$) zwischen der einwirkenden Noxe und den Versuchstieren, die zu unterschiedlichen Ergebnissen auch in den 30- und 40-Tage-Perioden führte.

Bei den UV-photometrischen Messungen des DNS-Gehaltes morphologisch abnormaler Spermien war je nach der Entstehungsweise dieser Mißbildungen ein veränderter DNS-Wert zu erwarten. In der Literatur wird von recht unterschiedlichen Ergebnissen berichtet. MEYHÖFER (1963) und GLEDHILL (1966 b) fanden an einem kleinen und wohl auch heterogenen Untersuchungsmaterial DNS-Werte differierender Art. In Kopfmißbildungen von Spermien jedoch, deren Vorstufen durch Röntgenstrahlen (BOTZENHARDT 1971) oder genetisch bedingt (STOLLA und GROPP 1973) geschädigt waren, traten zwei Populationen von Samenzellen auf, wobei der DNS-Gehalt der einen Gruppe sich im haploiden, der der anderen Gruppe sich im diploiden Bereich bewegte.

Bei den phänotypisch abnormalen Spermien war das hervorstechendste Merkmal eine signifikante Erhöhung der Standardabweichung des DNS-Gehaltes ($P < 0,01$). Diese erhöhte Variabilität war im wesentlichen durch das Vorkommen von mißgebildeten Samenzellen mit einem DNS-Gehalt im diploiden Bereich bedingt. Auch die mißgebildeten Spermien mit einem DNS-Gehalt haploider Zellen wiesen eine größere Varianz auf ($P < 0,005$; Tabelle 13). Bei diesen Untersuchungen wurden zwar wesentlich weniger Spermien mit diploidem Charakter gefunden als bei Röntgenbestrahlung der Testes von Bullen (BOTZENHARDT 1971), trotzdem war aber eine eindeutige Erhöhung gegenüber spontan auftretenden Samenzellen mit einem DNS-Gehalt im diploiden Bereich festzustellen, wie sie SALISBURY und BAKER (1966) bzw. ESNAULT und ORTAVANT (1967) beobachteten.

Die Erhöhung der Standardabweichung gegenüber der Kontrolle nach Eliminierung aller Spermien mit einem DNS-Gehalt im

diploiden Bereich könnte dahingehend interpretiert werden, daß in diesen Spermienpopulationen ein vermehrter Anteil chromosomal unbalancierter Spermien vorhanden war. Diese Samenzellen könnten aber auch auf eine Störung der Verteilungsprozesse während der ersten Meiose (STOLLA und GROPP 1973) und in einigen Fällen auch auf eine Beeinträchtigung der DNS-Synthese (SIMARD und BERNHARD 1967) zurückzuführen sein.

Die in der 20-Tage-Periode festgestellte Erhöhung der Standardabweichung ist hauptsächlich auf 2 Bullen zurückzuführen, die in ihrem DNS-Gehalt sehr weit abwichen. Diploide Werte konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine lokale, testikuläre Wärmenoxe eine Teratospermie zur Folge hat. Spermien, deren Vorstufen in der Transformationsphase, in der ersten und auch in der zweiten meiotischen Teilung geschädigt wurden, zeigen einen erhöhten Anteil von Kopfmißbildungen. Die lokale Hodenerwärmung führt weiterhin zu Störungen des DNS-Gehaltes von Spermien. Ursache dafür können das Ausbleiben einer Reifeteilung, chromosomale Verteilungsstörungen oder Eingriffe in die DNS-Synthese der Spermienvorstufen sein. Die Auswirkung entspricht in mancher Hinsicht der Wirkung von Röntgenstrahlen, jedoch in einer bedeutend geringeren Intensität. Entscheidend für die Art der Schädigung des Keimepithels dürfte die Dosierung der Wärmenoxe sein.

VI ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei fünf Bullen wurde der DNS-Gehalt morphologisch normaler und abnormaler Spermien UV-photometrisch bestimmt. Zur Erzeugung eines vermehrten Anteiles primärer Kopfmißbildungen wurden die Hoden der Bullen in einem Wasserbad von 43°C über einen Zeitraum von $4\frac{1}{2}$ Stunden erwärmt.
2. Pro Bulle wurden 50 morphologisch normale Spermien aus einem Ejakulat vor (Kontrollperiode) und 20, 30 bzw. 40 Tage nach lokaler, testikulärer Erwärmung gemessen, ebenso 50 morphologisch abnormale Spermien aus denselben Ejakulaten der Versuchsperiode 20, 30 und 40 Tage nach Einwirkung der Wärmenoxe.
3. Im Sperma aller Bullen war eine deutliche Erhöhung ($P < 0,01$) primärer Kopfmißbildungen in den Versuchsperioden zu beobachten.
4. Der DNS-Gehalt morphologisch normaler Spermien zeigte in den einzelnen Versuchsperioden keine einheitliche Tendenz. In der 20-Tage-Periode trat eine DNS-Vermin- derung ein.
5. Morphologisch mißgebildete Spermien ließen in den Versuchsperioden eine gegenüber der Kontrolle bedeu- tend größere Standardabweichung erkennen. Dieses Phänomen war bei den Spermien, die 30 und 40 Tage nach der Noxe gewonnen wurden, zum Teil durch das Auf- treten von Samenzellen im diploiden Bereich bedingt.
6. Eine lokale, testikuläre Wärmenoxe führt zu einer Teratospermie. Die Änderungen des DNS-Gehaltes können als Hinweis angesehen werden, daß diese Mißbildungen durch Chromosomenverteilungsstörungen und Eingriffe in die Spermientransformation entstehen.

VII SUMMARY

1. The DNA content was evaluated by UV-photometrie in morphologically normal and abnormal bovine spermatozoa. For inducing abnormal spermatozoa testes of 5 bulls were suspended for about 4 1/2 hours in a water bath of 43 ° C.
2. From each bull 50 morphological normal spermatozoa were measured before and 20, 30 and 40 days after disarrangement of spermatogenesis. In the same way morphologically misshapen sperm-heads were measured 20, 30 and 40 days after disturbance.
3. An increase ($P < 0,01$) of spermatozoa with pathological heads appeared in all periods.
4. The DNA content of morphologically normal spermatozoa was very different among the periods. The DNA content was reduced 20 days after warming the testes.
5. The standard deviation of pathological spermatozoal heads was larger in all periods than in normal spermatozoa of the control test. This was attributed to the presence of spermatozoa with a DNA content of diploid cells in the time of 30 and 40 days after warm water application.
6. The effect of this experiment on the testes can be judged as teratospermy. Moreover the DNA content of morphological deformed spermatozoal heads was changed. Finally pathological spermatozoa were produced by disturbances of chromosomes and of cell-transformation in spermatogenesis.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- ALBA, J. de and S. RIERA (1966): Sexual Maturity and Spermatogenesis under Heat Stress in the Bovine.
Anim. Prod. 8, 137
- AMANN, R.P. and J.D. ALMQUIST (1962): Reproductive capacity of dairy bulls.
VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production.
J. Dairy Sci. 45, 774
- ASDELL, S.A. and G.W. SALISBURY (1941): The rate at which spermatogenesis occurs in the rabbit.
Anat. Rec. 80, 145
- BERCHTOLD, M. (1963): Spermiogenese. In "Die künstliche Besamung bei den Haustieren" von F. Schaetz.
Verlag G. Fischer, Jena
- BHARGAVA, P.M., BISHOP, M.W.H. and T.S. WORK (1959): The chemical compositions of bull semen with special reference to nucleic acids, free nucleotides and free amino-acids.
Biochem. J. 73, 242
- BISHOP, M.W.H. and A. WALTON (1960): Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. In "Marshall's Physiology of Reproduction". 3 rd. ed. Vol. 1.
Longmans, Green, N.Y.
- BLOOM, W. and D. FAWCETT (1968): "A Textbook of Histology".
9 th. ed.
Saunders, Philadelphia
- BOSSE, H.G. und W. MEYHÖFER (1970): Cytophotometrische Messungen des Histonproteingehaltes, des Desoxyribonucleinsäuregehaltes und des Tyrosin/Tryptophangehaltes von Spermatozoen fertiler und subfertiler Männer.
Andrologie 2, 23

- BOTZENHARDT, A. (1971): Der DNS- und Histongehalt normaler und abnormaler Spermien.
Vet. med. Diss. München
- BOUTERS, R. und H. VANDEFLASSCHE (1964): Veränderungen im Bullensamen nach experimenteller Infektion mit einem Enterovirus.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 87
- BOUTERS, R., ESNAULT, C., ORTAVANT, R. and G.W. SALISBURY (1967): Comparison of DNA revealed by Feulgen and by Ultraviolet Light in rabbit spermatozoa after storage in the male efferent ducts.
Nature 213, 181
- BOVIN, A., VENDRELY, R. et C. VENDRELY (1948): L'acide déoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires, arguments d'ordre analytique.
Compt. rend. Acad. Sci. 226, 1061
- CASADY, R.B., MYERS, R.M. and J.E. LEGATES (1953):
The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull.
J. Dairy Sci. 36, 14
- CASPERSSON, T. (1936): Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns.
Skand. Arch. Physiol. 73, 8
- CHOWDHURY, A.K. and E. STEINBERGER (1964): A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes.
Am. J. Anat. 115, 509

- CLEGG, E.J. (1963): Studies on artificial cryptorchidism.
Degenerative and regenerative changes in
the germinal epithelium of the rat testis.
J. Endocrin. 27, 241
- COUROT, M., HOCHEREAU de REVIERS, M.T. and R. ORTAVANT
(1970): Spermatogenesis, in "The Testis",
Vol I, 6, ed. by Johnson, A.D., Gomes, W.R.
und N.L. Vandemark.
Acad. Press, N.Y.-London
- DÖRING, L., GROPP, A. and U. TETTENBORN (1972): DNA-content
and morphological properties of presumably
aneuploid spermatozoa of tobacco mouse hybrids.
J. Repr. Fert. 30, 335
- ELAZAB, E.A. (1966): Die Auswirkung lokaler Wärmeapplikation
am Skrotum auf Spermatogenese, Reifung der
Spermien im Nebenhoden und Spermabeschaffen-
heit bei Kaninchen und Stieren.
Vet. med. Diss. München
- ESNAULT, C. et R. ORTAVANT (1967): Origine des spermato-
zoïdes diploïdes présents dans l'éjaculat
d'un taureau Charolais.
Ann. Biol. Anim., Biochim., Biophys. 7, 25
- GLEDHILL, B.L. (1966 a): Studies on the DNA content, nuclear
protein and dry mass of bull spermatids and
spermatozoal heads with aspects on fertility.
Tryckeri Balder A.B., Stockholm
- GLEDHILL, B.L. (1966 b): Studies on the DNA content, dry
mass and optical area of morphologically
normal and abnormal bull spermatozoal heads.
Acta vet. scand. 7, 1
- GLEDHILL, B.L. (1966 c): Studies on the DNA-content, dry
mass and optical area of ejaculated spermato-
zoal heads from bulls with normal and lowered
fertility.
Acta vet. scand. 7, 166

- GLEDHILL, B.L., GLEDHILL, M.P., RIGLER, R. and N.R.
RINGERTZ (1966): Changes in deoxyribonucleoprotein
during spermatogenesis in the bull.
Exp. cell res.41, 652
- GLEDHILL, B.L. GUSTAVSON, J. and B. HENRICSON (1970): DNA
content of presumed aneuploid spermatozoa.
Hereditas 65, 291
- GLOVER, T.D. (1966): The influence of temperature on flow
of blood in the testis and scrotum of rats.
Proc. Roy. Soc. Med. 59, 765
- GÖTZE, R. (1949): Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.
Verlag Schaper, Hannover
- GROPP, A., TETTENBORN, U. und E. LEHMANN (1970): Chromosomen-
variation vom Robertson'schen Typus bei der Tabak-
maus, *M. poschiavinus*, und ihren Hybriden mit der
Laboratoriumsmaus.
Cytogenetics 9, 9
- GROPP, A. (1973): Reproductive failure due to fetal an-
euploidy in mice.
VII. World Congr. Fert. Ster., Tokyo/Kyoto, 1971
- GROPP, A., GIERS, D., BURTESSHAW, M.D., CLEGG, H., EVANS, E.P.
and C.E. FORD (1973, in preparation): Fetal an-
euploidy and selective mortality causing impaired
fertility in *M. poschiavinus* x *M. musculus* hybrids.
- GROSHKOVA, K.N. (1964): Testicular lesions of mycotic origin
in rams with necrospermia.
Veterinariya, Moskau, 41, 85
- GÜENSEL, E. (1949): Über die Wärmeempfindlichkeit des Keim-
epithels im Rattenhoden.
Strahlentherapie 80, 299
- HENRICSON, B. and L. BÄCKSTRÖM (1964): A systematic study of
the meiotic divisions in normal and subfertile or
sterile boars and bulls.
J. Repr. Fert. 7, 53

- HOCHEREAU, M.T. (1967): Synthèse de l' ADN au cours des multiplications et du renouvellement des spermatogonies chez le taureau.
Arch. Anat. Microscop. Morph. 56, 85
- HOCHEREAU de REVIERS, M.T. (1970): Etude des divisions spermatogoniales et du renouvellement de la spermatogonie souche chez le taureau.
Thèse Doct. D'Etat Es-Sciences Mat., Paris
- JONES, K.W. and F.W. ROBERTSON (1970): Localisation of reiterated nucleotide sequences in drosophila and mouse by in situ hybridisation of complementary RNA.
Chromosoma 31, 331
- JONES, K.W., PURDOM, J. and A. GROPP:
(unveröffentlicht)
- KNUDSEN, O. (1954): Cytomorphological investigations into the spermiocytogenesis of bulls with normal fertility and bulls with acquired disturbances in spermiogenesis.
Acta pathol. Microbiol. Scand. 101, 1
- KNUDSEN, O. (1958): Studies on spermiocytogenesis in the bull.
Intern. J. Fert. 3, 389
- KNUDSEN, O. (1961 a): Sticky chromosomes as a cause of testicular hypoplasia in bulls.
Acta vet. scand. 2, 1
- KNUDSEN, O. (1961 b): Testicular hypoplasia with multipolar spindle formation in the spermiocytes of the bull.
Acta vet. scand. 2, 1
- KOEFOED-JOHNSON, H.H. (1960): Influence of ejaculation frequency on the time required for sperm formation and epididymal passage in the bull.
Nature 185, 49

- KORDTS, E. und H.H. HILDEBRAND (1958): Untersuchungen über unterschiedliche Aufzuchtintensitäten an Zwillingsbullen unter besonderer Berücksichtigung ihres späteren Befruchtungsvermögens (Spermaqualität).
Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 10, 481
- KRAMER, M.F. (1960): Spermatogenesis bij de stier.
Med. vet. Diss., Utrecht
- KRZANOWSKI, M. and R. MACKOWSKA (1969): Differences in DNA content in the spermatozoa of regulary fertile bulls.
Fol. Biol. 17, 4
- LAMAS, N.J.K. and R. RODGERS (1943): Season and human fertility in Galveston, Texas.
Anat. Record 87, 453
- LANG, W. (1965): Ermittlung des DNS-Gehaltes einzelner Zellen aus Extinktionsmessungen mit Hilfe der Cytospektrophotometrie. Teil I und II.
Optik 23, 2 und 3
- LAVON, U., VOLCANI, R. and D. DANON (1971): The proteins of bovine spermatozoa from the caput and cauda epididymidis.
J. Repr. Fert. 24, 219
- LEIDL, W. (1964): Degeneration und Regeneration des Keimepithels beim Bullen nach Röntgenbestrahlung.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 71, 670
- LEIDL, W. und M. BERCHTOLD (1964): Die Auswirkung testikulärer Röntgenbestrahlung auf das Keimepithel und die Spermabeschaffenheit beim Bullen.
Bericht über d. V. Int. Kongr. über d. tier. Fortpflanzung u. d. künstl. Besamung. Trient Bd. III, 408

- LEIDL, W. (1968): Steuerung und Beeinflussung der Samen-
bildungsprozesse.
Z. Tierz. u. Züchtungsbiol. 84, 273
- LEIDL, W. and R. STOLLA (1969): Individual difference of
UV-DNA in spermatozoa of boars.
J. Repr. Fert. 18, 173
- LEIDL, W., STOLLA, R. und A. BOTZENHARDT (1971 a): Der
DNS-Gehalt normaler und abnormaler Spermien
(unveröffentlicht).
VII. World Congr. Fert. Ster., Tokyo 1971
- LEIDL, W., SCHEFELS, W., STOLLA, R. und E. METZGER (1971 b):
Differenzierung und Befruchtungsvermögen
pathologischer Spermien.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 129
- LEUCHTENBERGER, C., SCHRADER, F., WEIR, D.R. and D.P.
GENTILE (1953): The desoxyribosenucleic
acid (DNA) content in spermatozoa of fertile
and infertile human males.
Chromosoma 6, 61
- LEUCHTENBERGER, C., WEIR, D.R., SCHRADER, F. and L. MURMANIS
(1955): The desoxyribosenucleic acid (DNA)
content in spermatozoa of repeated seminal
fluids from fertile and infertile men.
J. Lab. Clin. Med. 45, 851
- LEUCHTENBERGER, C., MURMANIS, I., MURMANIS, L., ITO, S. and
D.R. WEIR (1956): Interferometric dry mass
and microspectrophotometric arginine
determinations on bull sperm nuclei with
normal and abnormal DNA content.
Chromosoma 8, 73
- LEUCHTENBERGER, C., WEIR, D.R., SCHRADER, F. and R. LEUCHTEN-
BERGER (1957): Decreased amounts of desoxyribose
nucleic acid (DNA) in male germ cells as a
possible cause of human male infertility.
Acta genetica 6, 272

- MAC LEOD, J. and R.S. HOTCHKISS (1941): The effect of hyperpyrexia upon spermatozoa counts in men.
Endocr. 28, 780
- MAC LEOD, J. (1952): Certain concepts in human male fertility.
J. Urol. 67, 19
- MANN, T. and A. WALTON (1953): Rowson L.E. in "Reproduction in Domestic Animals", ed. by Cole H.H. und R.T. Cupps, Vol II
Acad. Press N.Y.
- MAZZARRI, G., Du MESNIL du BUISSON, F. and R. ORTAVANT (1968): Action of temperature on spermatogenesis, sperm production and fertility of the boar.
Proc. 6th Int. Congr. Anim. Repr., Paris, 1, 305
- MEYHÖFER, W. (1963): Mikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermien fertiler und infertiler Männer.
Arch. klin. exp. Dermat. 216, 556
- MOORE, C.R. (1924): Properties of the gonads as controllers of somatic and psychical characteristics. VI. Testicular reactions in experimental cryptorchidism.
Am. J. Anat. 34, 269
- MOULE, G.R. and G.M.H. WAITES (1963): Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum.
J. Repr. Fert. 5, 433
- MUDRA, A. (1958): Statistische Methoden für Landwirtschaftliche Versuche.
Verl. P. Parey, Berlin

- MUKHERJEE, A.B. and M.M. COHEN (1968): DNA-synthesis during meiotic prophase in male mice. *Nature* 219, 489
- NELSON, W.O. (1951): Mammalian spermatogenesis. Effect of experimental cryptorchidism in the rat and non-descent of the testes in man. *Recent Progr. Horm. Res.* 6, 29
- NELSON, W.O., STEINBERGER, E. and A. NOCJABELLA (1954): Recovery of spermatogenesis in rats treated with nitrofurans. *Anat. Rec.* 118, 333
- NIEBERLE, K. (1952): Männliche Geschlechtsorgane aus "Nieberle-Cohrs, Lehrbuch der spez. path. Anat. d. Haustiere". III. Aufl. Verl. G. Fischer, Jena
- OAKBERG, E.F. (1955): Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. *Rad. Res.* 2, 369
- OAKBERG, E.F. and R.L. di MINNO (1960): X-ray sensitivity of primary spermatocytes of mouse. *Int. J. Rad. Biol.* 2, 196
- ORTAVANT, R. (1958): Le cycle spermatogénétique chez le bélier. D. Sc. Thesis, Paris
- ORTAVANT, R. (1959): Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon. In "Reproduction in Domestic Animals", ed. by Cole H.H. und P.T. Cupps, Vol II, 1 Acad. Press, N.Y.-London
- PAYNE, J.M. (1956): The degenerative changes in the adult mouse testis returned to the abdominal cavity. *J. Pathol. Bacteriol.* 71, 117

- ROOSEN-RUNGE, E.C. (1955): Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. III. Changes in the cells of the seminiferous tubules.
Anat. Record 123, 385
- ROOSEN-Runge, E.C. (1969): Comparative aspects of spermatogenesis.
Biol. Reprod. 1, 24
- RUGH, R. (1960): General Biology. In: "Mechanism of Radiobiology", ed. by Errera M. and A. Forssberg, Vol II, 1
Acad. Press, N.Y.-London
- SALISBURY, G.W. and F.N. BAKER (1966): Frequency of occurrence of diploid bovine spermatozoa.
J. Repr. Fert. 11, 477
- SANDRITTER, W. (1958): Ultraviolett-mikrospektrophotometrie. Aus: "Handbuch der Histochemie", Bd. I, 1
Verl. G. Fischer, Stuttgart
- SANDRITTER, W., MÜLLER, D. und O. GENSECKE (1960): Ultraviolett-mikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermien und diploiden Zellen.
Acta Histochem. 10, 139
- SCHAETZ, F. (1965): Fortpflanzungsstörungen beim Rind. I. Gestörte Fruchtbarkeit beim Bullen. In "Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren", von Küst, D. und F. Schaetz.
Verl. F. Enke, Stuttgart
- SETCHELL, B.P., WAITES, G.M.H. and G.D. THORBURN (1966): Blood flow in the testis of the conscious ram measured with krypton 85: effects of heat, catecholamines and acetylcholine.
Circulation Res. 18, 755
- SIMARD, R. and W. BERNHARD (1967): A heat sensitive cellular function located in the nucleolus.
J. Cell Biol. 34, 61

- SNEDECOR, G.W. (1962): Statistical methods.
Jowa State College Press
- STEINBERGER, E. and W.J. DIXON (1959): Some observations
of the effect of heat on the testicular
germinal epithelium.
Pert. steril. 10, 578
- STOLLA, R. (1968): Ultraviolett-mikrospektrophotometrische
Untersuchungen an Samenzellen unter be-
sonderer Berücksichtigung des DNS-Gehaltes
der X- und Y-Spermien.
Vet. med. Diss. München
- STOLLA, R. (1970): Neue Ergebnisse auf dem Gebiet der
quantitativen DNS-Bestimmung von Spermien.
1. Europäisches Kolloquium über Zytogenetik
und Säugetierkunde, Gießen, 12./13. Oktober
1970
- STOLLA, R. (1972): Individuelle und tierartliche Unter-
schiede des DNS-Gehaltes der Spermien.
Zbl. Vet. Med., 19, 327
- STOLLA, R. und A. GROPP (1972): Der DNS-Gehalt von Spermien
bei Mäusen mit Chromosomenvariationen. Bd. II,
1221
VII. Int. Congr. f. tier. Fortpflanzung,
München 1972
- STOLLA, R. and A. GROPP (1973, in Vorbereitung): Variation
of the DNA content of morphologically
normal and abnormal Spermatozoa in mice
susceptible to irregular meiotic segregation.
- STOLLA, R., BOTZENHARDT, A. und W. LEIDL (1973): Meiose-
störungen als vermutliche Ursache von ab-
normalen Spermien.
68. Vers. d. Anatom. Gesellschaft, Lausanne,
6. bis 12. April 1973

- SUMMERHILL, W.R. and D. ODDS (1961): Levels of deoxyribonucleic acid in bovine spermatozoa and their relationship to fertility.
J. Dairy Sci. 44, 548
- SWIERSTRA, E.E., WHITEFIELD, J.W. and R.H. FOOTE (1963): Action of amphotericin B (Fungizone) on spermatogenesis in the rabbit.
J. Repr. Fert. 7, 13
- SWIERSTRA, E.E. and R.H. FOOTE (1965): Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA-synthesis and labeling with tritiated thymidine.
Am. J. Anat. 116, 401
- SWIERSTRA, E.E. (1968): Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis.
Anat. Record 161, 171
- SWIFT, H. and R. KLEINFELD (1953): DNA in grasshopper spermatogenesis, oögenesis and cleavage.
Physiol. Zool. 26, 301
- TETTENBORN, U. and A. GROPP (1970): Meiotic nondisjunction in mice and mouse hybrids.
Cytogenetics 9, 272
- VENDRELY, R. et C. VENDRELY (1948): La teneur du noyau cellulaire en acide déoxyribonucleique à travers les organes, les individus et les espèces animales.
Experientia 4, 434

- VENDRELY, R. (1955): The nucleic acids. Bd. II
Acad. Press. N.Y.
- WAITES, G.M.H. and G. R. MOULE (1961): Relation of vascular
heat exchange to temperature regulation in
the testis of the ram.
J. Repr. Fert. 2, 213
- WAITES, G.M.H. and R. ORTAVANT (1967): Effects on spermatogonia and other cell types of a single period of temperature elevation in the testis.
Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci 45, 4
- WAITES, G.M.H. et R. ORTAVANT (1968): Effets précoces d'une brève élévation de la température testiculaire sur la spermatogenèse du bélier.
Ann. Biol. Anim., Biochim., Biophys. 8, 323
- WAITES, G.M.H. (1970): Temperature regulation and the testis.
In: "The Testis", ed. by Johnson, A.D., Gomes, W.R. and N.L. Vandemark.
Acad. Press, N.Y.-London
- WEBER, E. (1972): Grundriß der biologischen Statistik.
Verlag G. Fischer, Stuttgart
- WIMBER, D.E. and W. PRENSKY (1963): Autoradiography with meiotic chromosomes of the male newt (*Triturus viridescens*) using H^3 -thymidine.
Genetics 46, 1731
- WRETE, M. (1944): Combined effect of heat and gonadotropins.
Upsala läkaref. förh. 49, 165
- YOUNG, W. C. (1927): The influence of high temperature on the guinea pig testis.
J. Exptl. Zool. 49, 459

Herrn Prof. Dr. W. LEIDL möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas und das stets entgegengebrachte Interesse an dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, München, besonders Herrn Dr. R. Stolla, für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

Ich, Johann Maximilian W i d m a n n , wurde am 25. April 1945 als Sohn des Landwirtschaftsamtmannes Josef Widmann und seiner Frau Anna, geborene Breitsameter, in Niederscheyern, Landkreis Pfaffenhofen/Ilm (Bayern) geboren.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Pfaffenhofen/Ilm. Anschließend trat ich in das Humanistische Gymnasium in Scheyern über,wo ich im Sommer 1966 das Abitur absolvierte.

Im Wintersemester des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München. Hier bestand ich am 15. Oktober 1971 die Tierärztliche Prüfung und erhielt am 15. November 1971 die Bestallung als Tierarzt.

Von Mitte Oktober 1971 bis Ende Juli 1972 war ich als Doktorand an der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München tätig. Seit dem 1. August 1972 bin ich als Assistent in der Praxis des Herrn.Dr. Johann Wiest in Rain/Lech angestellt.

